

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Identificación rápida de especies del género *Vibrio*  
asociados con el cultivo de "langostino blanco"  
*Litopenaeus vannamei* **por** *amplified ribosomal DNA*  
*restriction analysis* (**ARDRA**)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Hidrobiología y  
Pesquería

**AUTOR**

Jimmy Ronald Dulanto Gomez

**ASESORES**

Jorge León Quispe

Carlos Augusto Yábar Varas

Rubén Alfaro Aguilera

**Lima – Perú**

**2013**



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE ESPECIES DEL GÉNERO *Vibrio*  
ASOCIADOS CON EL CULTIVO DE “LANGOSTINO BLANCO”  
*Litopenaeus vannamei* POR *Amplified Ribosomal DNA*  
*Restriction Analysis* (ARDRA)**

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en  
Hidrobiología y Pesquería.

Tesista	: Bach. Jimmy Ronald Dulanto Gomez
Asesor interno	: Mag. Jorge León Quispe
Asesores externos	: Mag. Carlos Augusto Yábar Varas. Blgo. Rubén Alfaro Aguilera

Lima -Tumbes – Perú  
2013

*En gratitud y recuerdo a los trabajadores  
del campo Domingo Rodas de la ex -  
empresa langostinera Domingo Rodas  
S.A., del verano del 2008.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, por todo lo que me dieron y a las personas que me brindaron apoyo, estima y confianza durante el desarrollo de este trabajo.

A mis tres asesores de tesis, por su apoyo en el planteamiento del proyecto, la parte experimental y la redacción de la tesis, sin duda sin su apoyo, este trabajo no se hubiera podido concretar.

A las autoridades de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por los permisos en sus respectivas instituciones y direcciones para la ejecución del presente trabajo.

A la Blga. Maribel Acuña del Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología (INS) por su apoyo en el proceso de secuenciamiento de ADN y el análisis de resultados.

A la Blga. María Luz Zamudio del Laboratorio de enteropatógenos (INS) por sus donaciones de cepas y al Blgo. William Quispe del Laboratorio de Zoonosis Parasitaria (INS), por sus aportes, enseñanzas y estima.

A la profesora Mónica Huamán (UNMSM) por sus recomendaciones, y a mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana de la UNMSM (Tania, Mirko, Nadia, Margot, Diego, Ulrike y Carlos) por su apoyo y su compañerismo.

A todos los trabajadores del laboratorio costero de Tumbes (IMARPE), por su compañerismo y apoyo durante mi estancia en dicha institución.

A la Blga. Carmen Ruiz por la donación de cepas e información y a los integrantes del Laboratorio de Microbiología Acuática de la sede central del IMARPE por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio.

A la Doctora María Luisa Guevara, el Doctor Ricardo Fujita, el Mg. Oscar Acosta y los otros miembros del Centro de Genética y Biología Molecular de la Universidad San Martín de Porres, por permitirme aprender sobre biología molecular, por su paciencia y compañerismo.

Al Blgo. Miguel León de la empresa langostinera La Florida S.A., por permitirme muestrear en sus instalaciones y su apoyo incondicional.

Y a mis colegas investigadores de la UNMSM y UPCH, por brindarme apoyo en el desarrollo de la tesis.

## ABREVIATURAS

**A:** Absorbancia

**ARDRA:** *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*

**CTAB:** *Cetyltrimethylammonium bromide*

**DTAB:** *Dodecyl trimethyl ammonium bromide*

**dCTP:** *Deoxycytidine triphosphate*

**dATP:** *Deoxyadenosine triphosphate*

**dTTP:** *Deoxythymidine triphosphate*

**dGTP:** *Deoxyguanosine triphosphate*

**Buffer EB:** *Elution Buffer.*

**EDTA:** *Ácido Etilendiaminotetraacético*

**FASTA:** (Abreviación en idioma inglés)  
*Fast-all (Todo rápido) Fast-Protein, Fast-Nucleotide, etc.*

**g:** Gravedad

**M:** Molar

**m<sup>2</sup>:** Metros cuadrados

**mM:** Milimolar

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Magnesio

**mL:** Mililitro

**PM:** Peso Molecular

**NaCl:** Cloruro de Sodio

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**ng:** Nanogramos

**nm:** Nanómetros

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**pb:** Pares de bases

**Buffer PE:** *Wash buffer*

**pmol:** Picomol

**Buffer PB:** *Binding buffer*

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SDS:** *Sodium dodecyl sulfate*

**SSE:** Solución Salina Estéril.

**sp:** Especie no definida

**TAE:** Tris-base, ácido acético, EDTA

**Taq:** *Termus aquaticus*

**TCBS:** *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose*

**TE:** Tris – EDTA

**TSB:** *Trypticase Soy Broth*

**Tm:** *Temperature melting*

**TNE:** Tris - NaCl - EDTA

**U:** Unidades de enzima

**µg:** microgramo

**µL:** Microlitro

**V:** Voltio

**v/v:** Volumen del reactivo líquido por cada 100 mL de agua destilada (volumen/volumen)

**w/v:** Peso del reactivo sólido por cada 100 mL de agua destilada (peso/volumen)

**16S rDNA:** Región génica que expresa la subunidad 16S de ARN ribosomal.

**1X:** Concentración de un reactivo sin diluir.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	5
II. MARCO TEÓRICO .....	7
2.1. Generalidades del langostino blanco .....	7
2.2. Género <i>Vibrio</i> .....	9
2.3. La acuicultura de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	10
2.4. <i>Vibrio core group</i> .....	12
2.5. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN ribosomal 16S (Rodicio & Mendoza, 2004) .....	13
2.6. ARDRA: <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> ¿Por qué el nombre? (Vaneechoutte & Heyndrickx, 2001) .....	16
2.7. Antecedentes sobre la identificación de especies del género <i>Vibrio</i> por ARDRA 17	
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	17
3.1 Hipótesis .....	17
3.2 Objetivos .....	18
3.2.1 Objetivo General .....	18
3.2.2 Objetivos Específicos .....	18
IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
4.1. Estandarización del ARDRA en condiciones de laboratorio .....	19
4.1.1. Cepas bacterianas .....	19
4.1.2. Estandarización del ARDRA .....	20
4.1.2.1. Extracción de ADN por el método “TNE Buffer” (Marshall <i>et al.</i> 1999) .....	20
4.1.2.2. Extracción de ADN por el método DTAB/CTAB .....	21
4.1.2.3. PCR para la región 16S rDNA .....	22
4.1.2.4. Primera electroforesis en gel .....	24
4.1.2.5. Estandarización de la digestión enzimática .....	24
4.1.2.6. Segunda electroforesis en gel .....	26
4.2. Aplicación del ARDRA en cepas del género <i>Vibrio</i> aisladas a partir de un cultivo intensivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	26
4.2.1. Muestreo, transporte y disección de langostinos .....	26
4.2.2. Diluciones seriadas .....	28
4.2.3. Selección de las diluciones para la siembra .....	29
4.2.4. Siembra en medios de cultivo .....	30
4.2.5. Aislamiento y masificación en caldo de cultivo .....	30
4.2.6. Identificación por pruebas bioquímicas miniaturizadas .....	31



4.2.7.	Extracción de ADN .....	31
4.2.8.	PCR para la región 16S rDNA .....	31
4.2.9.	Digestión con la enzima de restricción <i>RsaI</i> .....	32
4.3.	Identificación de cepas candidatas de pertenecer al género <i>Vibrio</i> aisladas de un cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> por secuenciamiento de la región 16S rDNA.....	32
4.3.1.	Purificación de los productos de PCR .....	32
4.3.2.	Cuantificación de los productos de PCR purificados .....	33
4.3.3.	Secuenciamiento de la región 16S rDNA de los vibrios .....	34
4.3.4.	Análisis bioinformático.....	36
4.4.	Diseño de la identificación rápida de especies del género <i>Vibrio</i> asociados con el cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> por ARDRA.....	39
4.4.1.	Selección bioinformática de enzimas de restricción .....	39
4.5.	Valoración diagnóstica bioinformática .....	39
4.5.1.	Validación computacional del ARDRA para identificar el <i>Vibrio core group</i> 39	
4.5.2.	Validación computacional del ARDRA para identificar <i>Vibrio communis</i> ..	40
V.	RESULTADOS .....	41
5.1.	Estandarización de condiciones de crecimiento para el género <i>Vibrio</i> .....	41
5.2.	Estandarización de la extracción de ADN .....	42
5.3.	Estandarización de la digestión enzimática para 16S rDNA de Vibrios .....	43
5.3.1.	Prueba para determinar el mejor tampón para la reacción enzimática .....	43
5.3.2.	Prueba para determinar el mejor modo de detención enzimática .....	45
5.4.	Características culturales y pruebas bioquímicas primarias .....	47
5.5.	Pruebas bioquímicas miniaturizadas .....	49
5.6.	Extracción de ADN .....	49
5.7.	Producto de PCR para la región 16S rDNA .....	52
5.8.	Aplicación del ARDRA en las cepas aisladas .....	52
5.9.	Cuantificación de los productos purificados de PCR de las 4 cepas candidatas de pertenecer al género <i>Vibrio</i> .....	54
5.10.	Secuencias de la región génica 16S rDNA de bacterias presuntivas del género <i>Vibrio</i> .....	54
5.11.	Análisis filogenético .....	56
5.11.1.	Secuencias incluidas en el análisis filogenético .....	56
5.11.2.	Árbol filogenético .....	59
5.12.	Selección de enzimas de restricción por análisis bioinformático .....	59
5.13.	Valoración diagnóstica bioinformática .....	62
5.14.	Cálculo de la sensibilidad y especificidad del ARDRA para identificar especies del género <i>Vibrio</i> asociados al cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	65
5.15.	Flujograma comparativo entre el ARDRA y el secuenciamiento de ADN para la identificación de especies bacterianas .....	66
VI.	DISCUSIÓN .....	67

<b>VII. CONCLUSIONES</b>	76
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b>	77
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	78
<b>X. ANEXOS</b>	86
Anexo 01. Caldo Tripticasa de Soja (TSB)	86
Anexo 02. Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sales biliares, Sacarosa)	86
Anexo 03. Agar Marino	87
Anexo 04. Agar BHI ( <i>Brain Heart Infusion</i> )	88
Anexo 05. Prueba de Catalasa	89
Anexo 06. Prueba de Oxidasa	89
Anexo 07. Prueba de asimilación de celobiosa	89
Anexo 08. Prueba de asimilación de sacarosa	90
Anexo 09. Prueba de asimilación de L-arabinosa	90
Anexo 10. Prueba de asimilación de D-manitol	91
Anexo 11. Prueba de asimilación de D-manosa	91
Anexo 12. Prueba de asimilación de D-galactosa	91
Anexo 13. Prueba de metabolismo oxidativo	92
Anexo 14. Prueba de metabolismo fermentativo	92
Anexo 15. Ornitina descarboxilasa	92
Anexo 16. Arginina dihidrolasa	93
Anexo 17. Voges Proskauer	93
Anexo 18. Indol	93
Anexo 19. Citrato de Simmons	94
Anexo 20. Bromuro de Etidio (1 µg/mL)	94
Anexo 21. Solución TAE 50X	94
Anexo 23. Solución TE	95
Anexo 24. Solución DTAB	95
Anexo 25. Solución disolvente	95
Anexo 26. Solución CTAB 5%	95
Anexo 27. SDS	96
Anexo 28. <i>TNE Buffer</i>	96
Anexo 29. Solución de extracción para el " <i>método TNE Buffer</i> "	96
Anexo 30. Tampón de lavado para secuenciamiento ( <i>Wash Buffer Clean-up</i> )	96

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los iniciadores universales para la región 16S rDNA.....	22
Tabla 2. Proporción de reactivos utilizadas en las pruebas de PCR.....	23
Tabla 3. Descripción del tipo de muestras y ubicación geográfica de los puntos de muestreo .	27
Tabla 4. Preparación de las muestras para las diluciones seriadas .....	29
Tabla 5. Esquema de las diluciones realizadas a las muestras para la siembra en medios de cultivo.....	30
Tabla 6. Proporción de reactivos de la mezcla maestra para la amplificación incompleta con el iniciador 8F.....	34
Tabla 7. Proporción de reactivos de la mezcla maestra para la amplificación incompleta con el iniciador 1510R .....	34
Tabla 8. Influencia de la salinidad en el crecimiento de los vibrios .....	41
Tabla 9. Calidad de ADN extraído por el método DTAB/CTAB y "TNE Buffer" .....	42
Tabla 10. Características fenotípicas de las 24 cepas aisladas y selección de 14 cepas diferenciales.....	47
Tabla 11. Pruebas bioquímicas miniaturizadas de las 14 cepas previamente seleccionadas y selección de 4 cepas candidatas. ....	50
Tabla 12: Calidad de ADN extraído de las 14 cepas bacterianas seleccionadas por relación de absorbancias entre 260 y 280nm.....	51
Tabla 13. Secuencias 16s rDNA de especies del género <i>Vibrio</i> incluidos en el análisis filogenético del presente estudio .....	58
Tabla 14. Resultado del análisis de enzimas de restricción diferenciales entre los cuatro vibrios aislados.....	60
Tabla 15. Selección de enzimas de restricción para la validación bioinformática .....	60
Tabla 16. Valoración diagnóstica bioinformática para el <i>Vibrio core group</i> y la especie <i>Vibrio communis</i> .....	62
Tabla 17: Cálculo de los valores de sensibilidad y especificidad del ARDRA para el <i>Vibrio core group</i> y la especie <i>Vibrio communis</i> .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida más típico de Penaeidae (FAO, 1974) .....	8
Figura 2. Clasificación taxonómica del langostino blanco (Feijó, 2009) .....	8
Figura 3. Clasificación taxonómica del género <i>Vibrio</i> (Garrity <i>et al.</i> , 2005).....	9
Figura 4. Ciclo de producción de <i>Litopenaeus vannamei</i> (FAO, 2006).....	11
Figura 5. Relación filogenética del <i>Vibrio core group</i> .....	12
Figura 6. Ubicación de los puntos de muestreo del estanque muestreado ( <i>Google Earth</i> , 2013) .....	27
Figura 7. Toma de parámetros biométricos y disección de langostinos.....	28
Figura 8. Purificación de productos de PCR de presuntos vibrios .....	33
Figura 9. Distribución geográfica de los vibrios incluidos en el análisis filogenético.....	37
Figura 10. Esquema del secuenciamiento por terminación fluorescente para la cepa 03 .....	38
Figura 11. Selección del método de extracción de ADN para la región 16S rDNA .....	42
Figura 12. Estandarización de detención con una enzima de restricción.....	44
Figura 13. Estandarización de detención usando dos enzimas de restricción.....	46
Figura 14. Resultados de la extracción de ADN de 14 cepas seleccionadas (método DTAB/CTAB) .....	51
Figura 15. Productos de PCR de la región 16S rDNA de las 14 cepas seleccionadas .....	52
Figura 16. Productos de PCR luego de la digestión con la enzima <i>RsaI</i> para las 14 cepas seleccionadas .....	53
Figura 17. Productos de PCR luego de la digestión con la enzima <i>HhaI</i> para las 14 cepas seleccionadas .....	53
Figura 18. Cuantificación de ADN de las 4 cepas candidatas de pertenecer al género <i>Vibrio</i> y la cepa referencial.....	55
Figura 19. Secuencias de la región 16S rDNA de los vibrios candidatos (CEPA_PERU) y la cepa referencial de <i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14033 .....	57
Figura 20. Árbol filogenético del <i>Vibrio core group</i> que incluye a los aislados en el presente trabajo .....	61

Figura 21. Flujograma para la identificación del <i>Vibrio core group</i> y la especie <i>Vibrio communis</i> por ARDRA.....	66
--	----

## RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo incorporar una metodología de identificación rápida conocida como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) para identificar especies del género *Vibrio*.

Se estandarizó la técnica con cepas referenciales. Luego, se aislaron cepas bacterianas asociadas con el cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas para encontrar cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio*. Al finalizar esta primera etapa, la técnica ARDRA estandarizada, fue aplicada en las cepas candidatas, confirmando de esta manera la factibilidad de la metodología bajo las condiciones estudiadas.

En una segunda etapa, se secuenció la región 16S rDNA para confirmar e identificar las cepas candidatas por análisis filogenético. Se reportaron tres especies diferentes con alta similitud pertenecientes al *Vibrio core group* (*Vibrio communis*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*). Con estos resultados, fue posible diseñar una identificación rápida por ARDRA para identificar el *Vibrio core group* y la especie *Vibrio communis*. La metodología de diseño del ARDRA fue soportado por una valoración diagnóstica bioinformática, obteniendo de esta evaluación, una sensibilidad y una especificidad de 97,1 y 76,9%, respectivamente para la identificación del *Vibrio core group*, mientras que para identificar la especie *Vibrio communis*, se obtuvo una sensibilidad y una especificidad de 100 y 97,4%, respectivamente.

Finalmente, se ha demostrado que es posible identificar ciertas especies del género *Vibrio* asociados con la acuicultura de *Litopenaeus vannamei*, por ARDRA y esta metodología de identificación, tiene la ventaja de ser mucho más rápido y económico en comparación con la identificación por análisis filogenético, teniendo a su vez la

desventaja de ser dependiente del uso del secuenciamiento en un primer momento para el diseño del ARDRA.

**Palabras clave:** *Litopenaeus vannamei*, ARDRA, *Vibrio communis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio core group*, evaluación diagnóstica bioinformática.

## ABSTRACT

The research aimed to incorporate a quick identification methodology known as ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) to identify *Vibrio* species.

Technique was standardized with reference strains. Then, bacterial strains were isolated associated with the cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Subsequently, biochemical tests were performed to find candidate strains belonging to the genus *Vibrio*. Upon completion of this first stage, the standard technique (ARDRA) was applied for candidate strains, thus confirming the feasibility of the method under the conditions studied.

In a second step, the 16S rDNA region sequenced to confirm and identify candidate strains for phylogenetic analysis. Three different species were reported with high similarity belonging to the *Vibrio core group* (*Vibrio communis*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*). With these results, it was possible to design a quick identification by ARDRA to identify the *Vibrio core group* and *Vibrio communis*. The design methodology ARDRA was supported by a bioinformatics diagnostic assessment, obtaining this evaluation, a sensitivity and specificity of 97,1 and 76.9% respectively for the identification of *Vibrio core group*, while identifying the species *Vibrio communis*, yielded a sensitivity and specificity of 100 and 97,4%, respectively.

Finally, it has proved possible to identify certain *Vibrio* species associated with aquaculture *Litopenaeus vannamei*, by ARDRA identification and this methodology has the advantage of being much faster and cheaper compared with the identification by phylogenetic analysis, having in turn, the disadvantage of being dependent on the use of the sequencing at first for ARDRA design.



**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, ARDRA, *Vibrio communis*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio core group*, bioinformatic diagnostic evaluation.

# I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura de peneidos es una actividad económica importante en el continente americano, y la industria se basa casi por completo en el cultivo del langostino blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Los productores de langostino del hemisferio occidental en el 2004, produjeron más de 200 000 toneladas métricas (TM) de langostino, generando más de 2 billones de dólares en ingresos y dando empleo a más de 500 000 personas (Lightner, 2011). La producción del hemisferio occidental representa el 20% del total mundial y los principales países productores son Ecuador, Brasil, Honduras y México. (Lightner, 2011).

Algunas especies del género *Vibrio* cumplen un rol muy importante en la producción de langostinos, no solo debido a que algunos miembros de este género son el principal patógeno bacteriano (Gomez-Gil *et al.*, 2004), sino porque algunos vibrios pueden ser probióticos (Vandenberghe *et al.*, 1999), y otros pueden mejorar la calidad del agua de los estanques como descomponedores de la materia orgánica (Thompson *et al.*, 2004). Estas características de los vibriones en conjunto influyen en la calidad de agua de los estanques de cultivo y por consiguiente repercuten en la mortalidad y morbilidad de los langostinos (Cruz *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009). Desde un punto de vista productivo, la mortalidad y morbilidad influyen en el valor de la tasa de conversión alimenticia y la velocidad de crecimiento de los langostinos cultivados respectivamente, justificándose de esta manera la necesidad de investigar sobre las relaciones interespecíficas existentes entre las especies del género *Vibrio* y *L. vannamei*.

En la zona costera noroccidental peruana, se lleva a cabo la acuicultura de *L. vannamei* en donde sólo algunas empresas langostineras realizan un monitoreo bacteriológico y de éstas, en lo que respecta a identificación de vibrios, sólo

determinan la presencia o ausencia de colonias amarillas o verdes en el medio selectivo de aislamiento conocido como Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS). Sin embargo, en esta interpretación existen tres problemas, el primero es que el medio selectivo TCBS en realidad no es un medio que permite solamente el crecimiento de miembros del género *Vibrio* e inclusive en algunos casos los otros grupos bacterianos crecen con mayor proporción que los vibrios (resultados obtenidos en este trabajo), el segundo problema es que dentro del género *Vibrio* las colonias con características culturales parecidas pueden corresponder a diferentes especies teniendo en cuenta que se tienen reportados 115 sólo hasta el 2011 (Chimetto *et al.*, 2011) y por último, la sistemática de vibrios ha ido modificándose con el tiempo, por lo que ex miembros del género *Vibrio* pasaron a pertenecer a otros géneros y viceversa. Ante esta problemática, el presente trabajo está dirigido a introducir una metodología conocida como ARDRA la cual sirve para identificar bacterias de una forma más rápida y económica en comparación con la forma tradicional (análisis filogenético de la región 16S rDNA) y aplicar esta metodología en la identificación de vibrios asociados con el cultivo de *L. vannamei* en el departamento de Tumbes.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades del langostino blanco

El “langostino blanco”, *Litopenaeus vannamei* es originario del este del Océano Pacífico distribuyéndose desde la provincia de Sonora (Norte de México) hasta el Departamento de Tumbes (Perú) (Feijó, 2009). Por lo general habita en aguas que mantienen un nivel de temperatura superior a los 20°C. La especie tiene una preferencia por los hábitats de fondos fangosos y se las puede encontrar hasta los 72m de profundidad tanto en aguas marinas como estuarinas. Durante las primeras etapas de su desarrollo el langostino blanco habita en aguas oceánicas, refugiándose luego en aguas costeras y/o estuarinas hasta la etapa de juveniles, momento en el que retornan al mar para reproducirse. Durante la época de apareamiento, las hembras eliminan aproximadamente de 100000 a 500000 huevos que son fecundados externamente durante el desove (Feijó, 2009). Después de un período de 14 a 20 horas desde el desove, las larvas eclosionan como nauplios, que constan de 5 subetapas (NI a NV), y luego pasan a los estadíos de protozoea (PI a PIII) y misis (MI a MIII). La metamorfosis se completa en el paso de misis III a postlarva I, etapa en la que los animales ya tienen todas las características básicas de un langostino adulto (Feijó, 2009) como se puede apreciar en la Figura 1. La longitud máxima reportada de los machos es de 187mm mientras que las hembras llegan hasta 230mm y como aspecto morfológico diferenciador a nivel de especie el rostrum de la especie *Litopenaeus vannamei* se caracteriza por tener de 8 a 9 dientes dorsales y de 1 a 2 dientes ventrales a diferencia de especies muy parecidas morfológicamente (Farfante, 1988). La clasificación taxonómica del langostino obedece al formato señalado en la Figura 2.

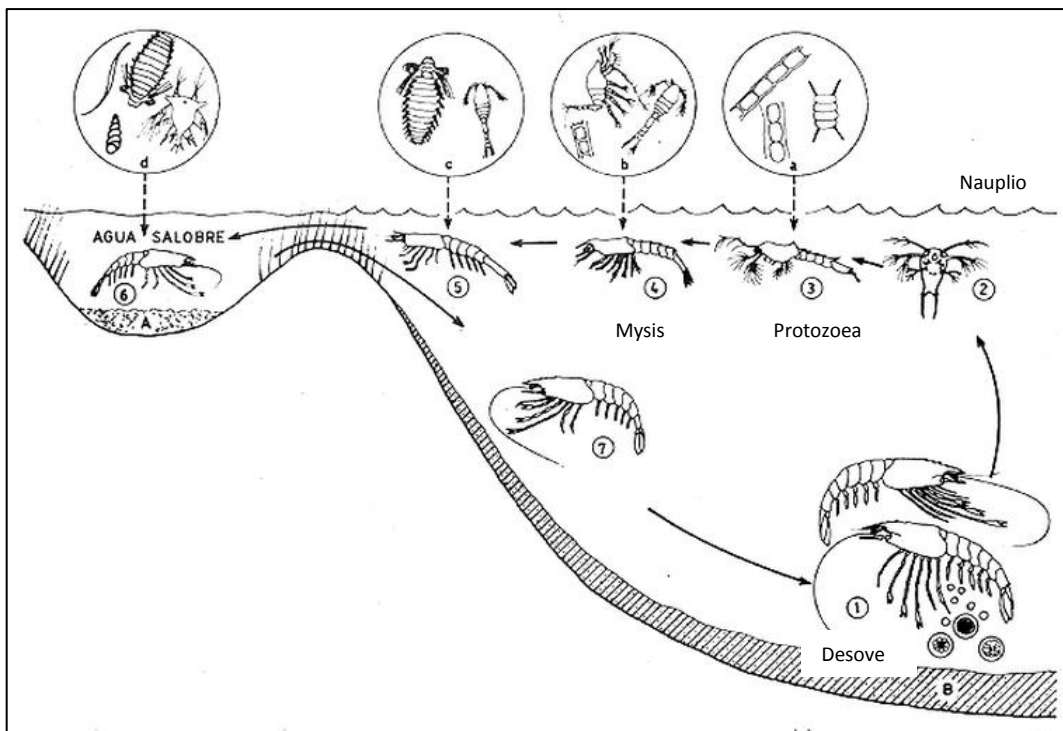


Figura 1. Ciclo de vida más típico de Penaeidae (FAO, 1974)

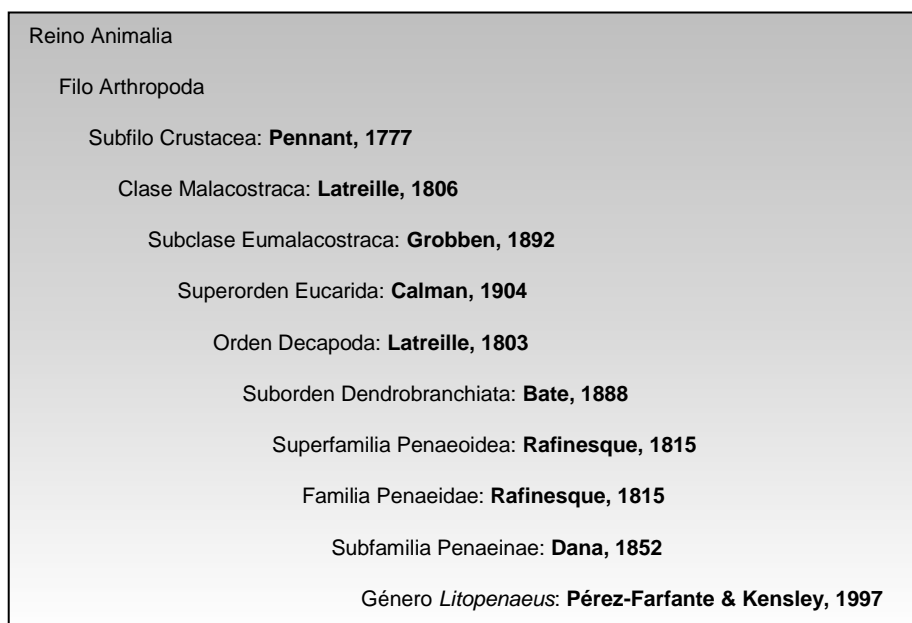
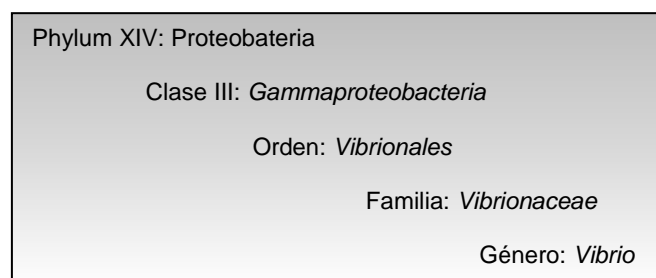


Figura 2. Clasificación taxonómica del langostino blanco (Feijó, 2009)

## 2.2. Género *Vibrio*

Los vibrios son habitantes comunes de ambientes acuáticos, especialmente en el océano, adoptando formas libres de vida, como simbioses de animales acuáticos o como parásitos de peces, crustáceos y moluscos (Thompson *et al.*, 2004). Algunos vibrios juegan un rol importante en la salud de los corales al proveer de protección en contra de patógenos o al contribuir con la fijación de nitrógeno dentro del holobionte (Chimetto *et al.*, 2011).

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae*, familia que a su vez forma parte del orden *Vibrionales*. Esta familia actualmente incluye seis géneros: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia* y *Aliivibrio* (Chimetto *et al.*, 2011) y la clasificación taxonómica del género se observa en la Figura 3.



**Figura 3.** Clasificación taxonómica del género *Vibrio* (Garrity *et al.*, 2005)

### 2.3. La acuicultura de *Litopenaeus vannamei*

El reporte de la FAO 2006 indica que existen 4 técnicas de engorde de *L. vannamei* (extensiva, semi-intensiva, intensiva y súper-intensiva). Para el caso de Perú la mayoría de empresas langostineras desarrolla un cultivo semi-intensivo con una densidad de siembra entre 10 y 30 postlarvas/m<sup>2</sup> (PL/m<sup>2</sup>) caracterizado por poca aireación (si fuese necesario) y rendimientos de 500 y 2 000 kg/ha/cosecha, con dos cosechas por año. El cultivo intensivo comprende una densidad de siembra de 60 a 300 PL/m<sup>2</sup> y un rendimiento de 8 hasta 50 000 kg/ha/cosecha en Belice e Indonesia. Por último el cultivo super-intensivo desarrollado en Estados Unidos soporta densidades de 300 hasta 450 juveniles/m<sup>2</sup> y se han logrado rendimientos de entre 28 000 y 68 000 kg/ha/cosecha. El ciclo de vida de *Litopenaeus vannamei* en cultivo se presenta en la Figura 4.

La mayoría de granjas de cultivo de *L. vannamei* en el Perú, no incluyen criaderos o *Hatcheries*, sino que el cultivo se inicia con postlarvas en estadíos PL 10 – 12 y características como resistencia, crecimiento rápido, fácil adaptación a los alimentos comerciales y buena tolerancia a los cambios ambientales han hecho que *L. vannamei* sea la especie de langostino más cultivada del mundo (FAO, 2006).

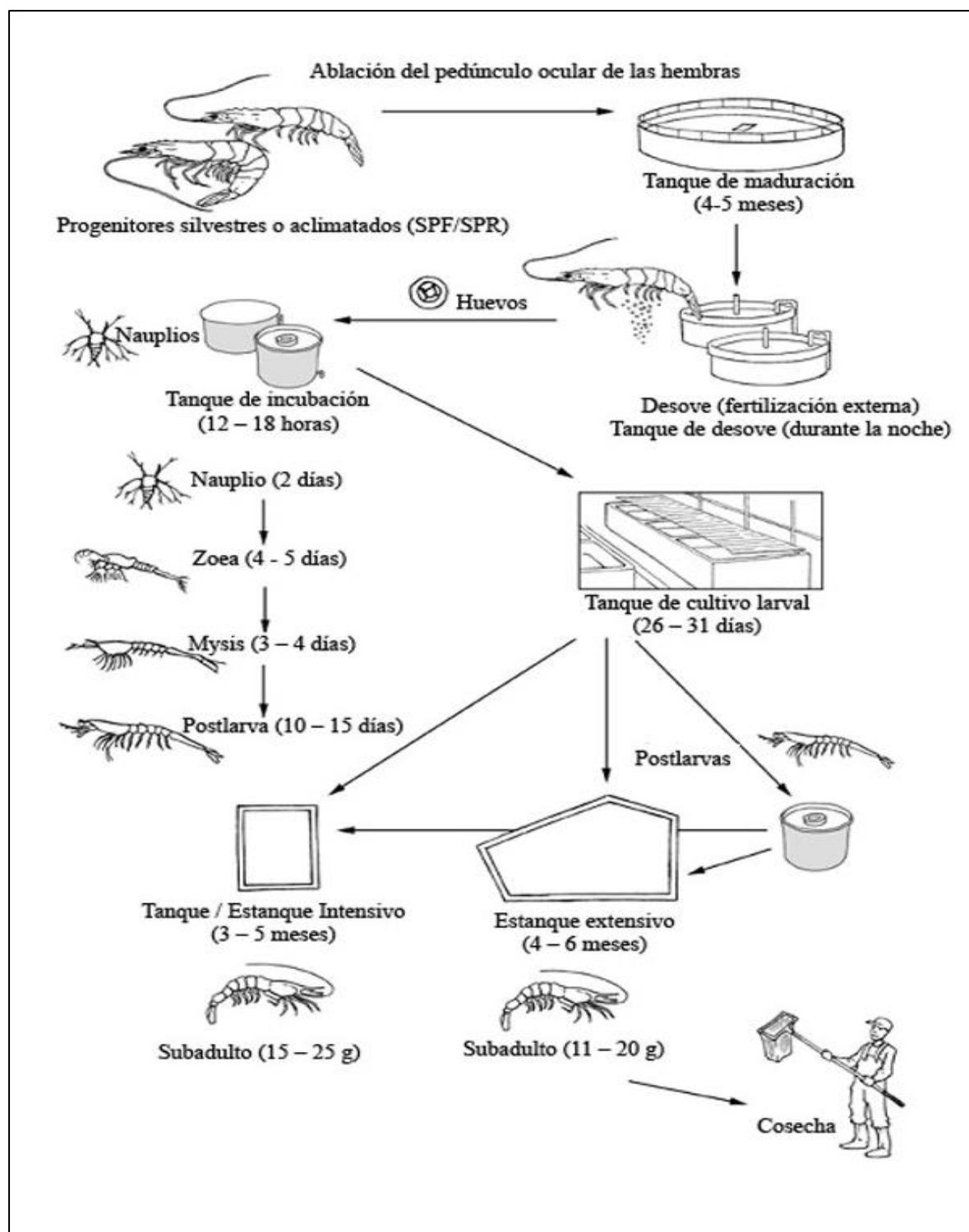


Figura 4. Ciclo de producción de *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2006)



## 2.4. *Vibrio* core group

Los miembros del *Vibrio* core group (Figura 5 tomado de Sawabe *et al.*, 2007) han sido descritos como cercanamente relacionados por alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA (Dorsch *et al.*, 1992), y. Las bacterias del *Vibrio* core group han sido asociadas con la enfermedad de la banda amarilla de los corales, la cual es una de las enfermedades más significativas de los corales de los trópicos (Chimetto *et al.*, 2011).

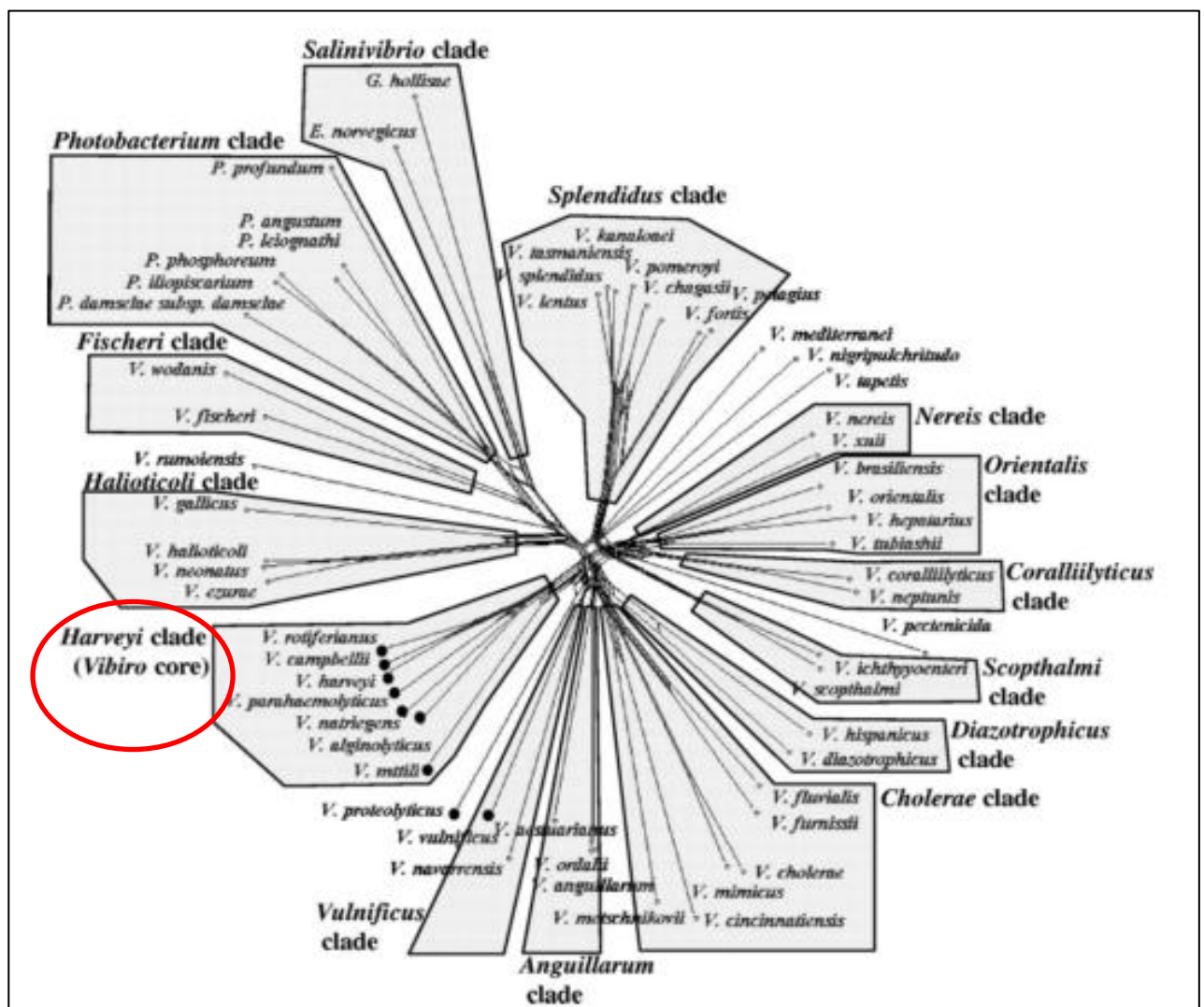


Figura 5. Relación filogenética del *Vibrio* core group

## **2.5. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN ribosomal 16S (Rodicio & Mendoza, 2004)**

El ARN ribosomal (rRNA) 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (16S rDNA), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARN ribosomal (rRNA) 16S se pliega en su estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el rRNA 18S es la macromolécula equivalente. Dado que los rRNA 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo rRNA SSU (del inglés, *small subunit*) se utiliza para ambos. Los rRNA SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los rRNA 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo.

El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15, siendo relativamente constante a nivel de especie, género e incluso familia. Entre las copias de los rRNA 16S codificadas por un mismo genoma se ha detectado un cierto grado de heterogeneidad (denominada microheterogeneidad). El análisis de 14 genomas bacterianos, cuya secuencia

completa se encuentra disponible, indicó una divergencia máxima del 1,23%, que corresponde al 16S rDNA de *Escherichia coli*. Además, diferentes autores encontraron variabilidad intragenómica entre los 16S rDNA de otras bacterias de interés clínico, cuyo genoma aún no ha sido secuenciado. Destaca la elevada heterogeneidad (1,43%) detectada entre las 4 copias del 16S rDNA presentes en la cepa clínica ADV 360.1 de *Veillonella*. Obviamente, la variabilidad intragenómica, tiene importantes implicaciones prácticas para la identificación. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, todas las copias del 16S rDNA de un organismo son idénticas o casi idénticas.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al gen 16S rRNA, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los 18S rRNA, a lo largo de toda la escala evolutiva. Además, los rRNA SSU contienen, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los 16S rARN (1500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas.

5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.

6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los 16S rDNA existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los 16S rDNA de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

Hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los 16S rDNA, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. En su ausencia, la especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN. Por otro lado, cepas con menos del 97% entre sus genes 16S rRNA, es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99 -100% a nivel de 16S rDNA.

## **2.6. ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* ¿Por qué el nombre? (Vaneechoutte & Heyndrickx, 2001)**

*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) o análisis de PCR-RFLP del (los) gen(es) de rRNA podría ser llamado más brevemente como “análisis de restricción del gen rRNA”, pero este nombre ha sido utilizado previamente para la ribotipificación por otros autores. La ribotipificación en realidad consiste en la hibridación selectiva de fragmentos de restricción con el cistrón rRNA como sonda, y que no tiene nada técnicamente y teóricamente en común con ARDRA. Para evitar la confusión, se ha sugerido que el término ARDRA sea utilizado para designar al PCR-RFLP de los genes rRNA. Para aumentar la confusión se tiene el hecho de que "PCR-ribotyping" se ha utilizado como un nombre para la amplificación de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rRNA sin restricción de la digestión posterior. Más confusión aún es ocasionado por el hecho de que el ribotipaje, ha sido comercializado bajo el nombre de “*riboprinting*” (Riboprinter; Europa Qualicon, Birmingham, Reino Unido), un término que ya estaba siendo usado para el ARDRA de eucariotas y también para bacterias y por tanto el término “*riboprinting*” no es actualmente usado. Como resultado de esta confusión nomenclatural, ARDRA parece ser en la actualidad el único nombre inequívoco en uso para denotar PCR-RFLP de los genes rRNA, mientras que también proporciona la mejor descripción de los diferentes aspectos técnicos involucrados. El Nombre PCR-ARDRA es aceptado pero redundante. Por último, ARDREA es una variante de nombre que se ha utilizado también para ARDRA.

## **2.7. Antecedentes sobre la identificación de especies del género *Vibrio* por ARDRA**

En el 2003 se realizó una investigación en Corea en donde se utilizó RFLP para la región 16S rDNA (ARDRA) y se logró identificar seis especies patogénicas del género *Vibrio* con el uso de diez endonucleasas de restricción: *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *Hsp 92II*, *MboI*, *MspI*, *PstI*, *RsaI* y *TaqI* (Yoon *et al.*, 2003).

El año 2006, en la bahía de Sagami - Japón, se realizó una prueba rápida de identificación de bacterias marinas bioluminiscentes por un análisis de amplificación de la región 16S rDNA seguido de cortes de restricción con cinco enzimas (*EcoRI*, *DdeI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI*) para obtener un patrón característico de las especies bacterianas y se concluyó que el ARDRA es una técnica útil y rápida para la identificación de la diversidad de especies bacterianas costeras (Kita-Tsukamoto *et al.*, 2006).

## **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 Hipótesis**

Es posible identificar especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de *Litopenaeus vannamei* por ARDRA en el departamento de Tumbes, bajo condiciones de laboratorio.

## 3.2 Objetivos

### 3.2.1 Objetivo General

- Identificar de forma rápida especies del género *Vibrio* asociados al cultivo de *Litopenaeus vannamei* usando la metodología conocida como ARDRA.

### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la técnica ARDRA con cepas referenciales de *Vibrio* sp.
- Obtener patrones de restricción de cepas asociadas al cultivo intensivo de *L. vannamei* aplicando el ARDRA estandarizado.
- Elaborar una primera relación filogenética con cepas peruanas del género *Vibrio* asociados al cultivo de *L. vannamei*, utilizando la región 16S rDNA.
- Diseñar un ARDRA para la identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados al cultivo de *L. vannamei*.
- Elaborar una valoración diagnóstica bioinformática de la técnica ARDRA para la identificación de especies del género *Vibrio* asociados al cultivo de *L. vannamei*.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología desarrollada tuvo 5 etapas secuenciales relacionadas con los objetivos específicos, la primera etapa fue la estandarización del método ARDRA en el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Instituto del Mar del Perú, sede Tumbes; la segunda correspondió a la aplicación de la metodología estandarizada en cepas bacterianas asociados al cultivo de *L. vannamei* para obtener patrones de restricción diferenciales, la tercera consistió en la identificación de los vibrios por análisis filogenético de la región 16S rDNA, la cuarta se basó en el diseño específico del ARDRA para identificar vibrios encontrados en el cultivo de *L. vannamei* y por último una valoración diagnóstica bioinformática de la técnica ARDRA como soporte para un posterior estudio de validación de la técnica para su aceptación y aplicación diagnóstica.

### 4.1. Estandarización del ARDRA en condiciones de laboratorio

#### 4.1.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas bacterianas, una referencial de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 donadas por el Laboratorio de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud y una cepa bacteriana de *Vibrio* de la colección perteneciente al Instituto del Mar del Perú (IMARPE).



#### **4.1.2. Estandarización del ARDRA**

La estandarización consistió en describir la mejor metodología para la extracción de ADN, condiciones de la PCR, condiciones de la digestión enzimática y condiciones de la electroforesis.

##### **4.1.2.1. Extracción de ADN por el método “*TNE Buffer*” (Marshall *et al.* 1999)**

Se incubaron las cepas referenciales en caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) en tubos de vidrio de 10 mL de volumen a temperatura del Laboratorio de Sanidad Acuícola (SLA) (28 – 30° C aprox.) durante 24 h, luego se verificó el crecimiento bacteriano por la turbidez presente, seguidamente se traspasó 1 mL de la suspensión bacteriana a un microtubo de 1,5 mL y se centrifugó a 12000 RPM durante 5 min para sedimentar las células, después se eliminó el sobrenadante, a continuación se pesó la biomasa de células en una balanza analítica. Este proceso se repitió las veces necesarias hasta llegar a obtener una biomasa de 15 mg.

A la biomasa de células bacterianas (15 mg) se le agregó 500 µL de tampón TNE (Tris-NaCl-EDTA) y luego se le adicionó 0,05 g de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) y 3 µL (~2,36 µL) de proteinasa K concentrada inicialmente a 21,2 mg/mL, con el objetivo de obtener una concentración final de 5% (w/v) de SDS y 100 µg/mL de proteinasa K, se dejó incubando a 55°C por 16 h. Luego de la lisis celular, se agregó 400 µL de la solución Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 12000 RPM durante 5 min. Luego de la extracción de ADN, se tomaron 200 µL del sobrenadante y se agregó esta solución a otro microtubo el cual contenía 200 µL de isopropanol.

Después se centrifugó a 12000 RPM durante 10 min. A continuación de la precipitación del ADN, se eliminó el sobrenadante y seguidamente se le adicionó 500 µL de alcohol al 75 %. Después del lavado del ADN se centrifugó a 12000 RPM por 2 min. Luego de eliminar el alcohol, se dejó secar al ADN colocando al microtubo invertido sobre un papel toalla durante 1 h. Finalmente se le agregó 200 µL de tampón TE (Tris 10 mM- EDTA 1 mM) a la masa de ADN extraído y se almacenó a -20 °C.

#### **4.1.2.2. Extracción de ADN por el método DTAB/CTAB**

Se incubaron las cepas referenciales en caldo TSB en tubos de vidrio de 10 mL de volumen a temperatura del laboratorio (28 – 30°C aprox.) durante 24 h, luego se verificó el crecimiento bacteriano por la turbidez presente, seguidamente se traspasó 1mL de la suspensión bacteriana a un microtubo de 1,5 mL y se centrifugó a 12000 RPM durante 5 min, después se eliminó el sobrenadante, a continuación se pesó la biomasa de células en una balanza analítica. Este proceso se repitió las veces necesarias hasta llegar a obtener una biomasa de 15 mg.

Al microtubo que contenía la biomasa de células bacterianas (15 mg) se le agregó 600 µL de solución DTAB y se lisaron a las células con ayuda de unos trituradores hasta obtener un homogenizado. Pronto, se incubó a 75°C por 15 min y se agitó en el “vortex”. Después, se adicionó 700 µL de cloroformo y se agitó nuevamente en el “vortex”. A continuación se centrifugó a 12000 RPM durante 5 min y se transfirió 250 µL del sobrenadante a otro tubo que contenía previamente 100 µL de solución CTAB y 900 µL de H<sub>2</sub>O destilada. Este nuevo microtubo se incubó a 75°C durante 5 min. Prontamente, se centrifugó a 12000 RPM durante 10 min. Inmediatamente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el ADN con 150 µL de solución disolvente (1,2 M de

NaCl) incubándolo a 75°C durante 5 min. En seguida, se centrifugó a 12000 RPM durante 5 min. Correlativamente, se transfirieron 150 µL de la solución a un nuevo microtubo que previamente contenía 300 µL de etanol absoluto. Este nuevo microtubo fue agitado en el “vortex” y se centrifugó a 12000 RPM durante 5 min. Tras esto, se eliminó el sobrenadante cuidando que no se caiga el ADN y se agregó 500 µL de etanol al 75% para lavar el ADN. Finalmente, el ADN fue resuspendido con 200 µL de tampón TE (Tris 10 mM- EDTA 1 mM) y almacenado a -20°C.

#### 4.1.2.3. PCR para la región 16S rDNA

Se utilizaron los iniciadores (*primers*) universales 8F y 1510R descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud *et al.*, 2003) con el fin de amplificar la región 16S rDNA constituida por 1500pb aproximadamente (Tabla 1) y la proporción de reactivos de la mezcla maestra para el PCR se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 1. Características de los iniciadores universales para la región 16S rDNA**

Iniciador	Secuencia nucleotídica	Tm
8F	5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´	54,3°C
1510R	5´ GGC TAC CTT GTT ACG A 3´	47,9°C

**Tabla 2. Proporción de reactivos utilizadas en las pruebas de PCR**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>Volumen utilizado por reacción (μL)</b>	<b>Concentración final en una mezcla maestra de 50 μL (por reacción)</b>
Agua ultrapura	--	39,8	--
dGTPs	100 mM	0,1	0,2 mM
dCTPs	100 mM	0,1	0,2 mM
dATPs	100 mM	0,1	0,2 mM
dTTPs	100 mM	0,1	0,2 mM
<i>Buffer Taq</i>	10 X	5	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3	1,5 mM
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/μL	0,4	2 U
<i>Primer 8F</i>	50 pmol/μL	0,2	0,2 pmol/μL
<i>Primer 1510R</i>	50 pmol/μL	0,2	0,2 pmol/μL
Muestra de ADN	--	1	--
TOTAL	--	50	--

Por referencias en la base de nucleótidos de la página *WEB* del *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se tuvo de conocimiento que la longitud de la región 16S rDNA de las especies del género *Vibrio* eran de 1500 pb aproximadamente, con esta información las condiciones de amplificación programadas en el termociclador (*9800 Fast Thermal Cycler*) fueron adoptadas de una estandarización previa realizada por el Laboratorio de Sanidad Acuicola – IMARPE para un fragmento de similar tamaño (1500 pb) las cuales fueron: Un ciclo inicial de denaturación completa a 94°C durante 4 min seguido de 30 ciclos (cada ciclo constituido de una denaturación a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y elongación a 72°C por 2 min), posteriormente la amplificación, fue concluida por una extensión final a 72°C durante 5 min y mantenida por el equipo a 4°C hasta el retiro de la microplaca.

#### **4.1.2.4. Primera electroforesis en gel**

Para la comprobación de la amplificación, se realizó una primera corrida electroforética horizontal. El gel fue preparado con 1% (w/v) de agarosa y 0,005% (v/v) de bromuro de etidio (el bromuro de etidio fue agregado antes de que el gel llegue a solidificar usando como solvente TAE 1X). La mezcla fue vertida en un molde para geles. Posteriormente, se colocó otro molde (en forma de “peine”) para formar los pocillos hasta que el gel esté completamente solidificado, luego se retiró el “peine”. Seguidamente, se colocó el gel solidificado dentro de la cámara electroforética y se agregó tampón de corrida TAE 1X hasta cubrir por completo el gel. A continuación, se colocaron los electrodos a una fuente de poder y se programó una administración de corriente eléctrica por 10 minutos a 120V constantes y amperaje variable.

#### **4.1.2.5. Estandarización de la digestión enzimática**

Con el objetivo de estandarizar la mejor forma de detención de la reacción enzimática para obtener una mejor visibilidad de bandas en el transiluminador, se usaron como variables comparativas en la detención enzimática dos tipos de tampón (10X *FastDigest®* y 10X *FastDigest® Green Buffer*) y 4 tipos de detención (fenol/cloroformo, cloroformo, fenol y -20°C de temperatura) con fines comparativos. La temperatura y duración de la incubación para el aseguramiento de la completa digestión enzimática fue de 65°C por 5 minutos de acuerdo a las especificaciones del producto (*Fermentas Life Sciences*).

### **Primer ensayo: Determinación del mejor tampón en la reacción**

La preparación de las premezclas para la digestión enzimática fue realizada en una cámara de flujo laminar para trabajar de forma aséptica y sobre un soporte de hielo para inhibir la actividad de las enzimas y lograr que la digestión empiece desde un mismo momento para todas las mezclas preparadas.

Se probaron dos formas de detención para la actividad enzimática, la primera por temperatura de -20°C y la segunda usando una suspensión de fenol - cloroformo en proporción de 25:24.

### **Segundo ensayo: Determinación del mejor modo de detención enzimática**

Se utilizó la enzima *HhaI* y se incluyó la enzima *RsaI*. Además, se tomó en consideración para la detención la temperatura a -20°C para ver su efecto en la nueva enzima.

La preparación de las premezclas para la digestión enzimática fue realizada en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación y sobre un soporte de hielo para inhibir la actividad de las enzimas y lograr que la reacción enzimática empiece desde un mismo momento para todas las mezclas preparadas.

Se agregaron los productos de PCR de las dos cepas de referencia y se planificaron diferentes tipos de detención.

#### **4.1.2.6. Segunda electroforesis en gel**

Para la visualización de los resultados, se preparó un gel de agarosa al 2 % (w/v) como se describió en el ítem 4.1.2.4., para un volumen de 180 mL usando TAE 1X como solvente y se usó una cámara de electroforesis horizontal grande. Se cargaron 10µL de los productos de PCR digeridos con 2 µL de tampón de depósito (Para el caso de los productos de PCR en donde se utilizó 10X *FastDigest® Green Buffer*, no se adicionó tampón de depósito). Se utilizó un tampón de corrida TAE 1X y el gel fue sometido a 80V constantes durante 60 min.

### **4.2. Aplicación del ARDRA en cepas del género *Vibrio* aisladas a partir de un cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei***

#### **4.2.1. Muestreo, transporte y disección de langostinos**

Se eligió un tipo de muestreo no probabilístico dirigido (langostinera abastecida con agua de mar) y con el objetivo de incrementar la probabilidad de obtener una mayor riqueza de vibrios se eligieron varias fuentes de muestreo, el cual se realizó el 15 de Febrero del 2012 descritas en la Tabla 3 y Figura 6.

**Tabla 3. Descripción del tipo de muestras y ubicación geográfica de los puntos de muestreo**

Punto(s) de muestreo	Muestra colectada	Coordenadas UTM (*)		
		ESTE	NORTE	ZONA
A, B y C	10 langostinos “enfermos”	A:522885.97	A:9584191.69	17M
A, B y C	10 langostinos “sanos”	B:522931	B:9584198.74	17M
B	Columna de agua de cultivo	C:522978.19	C:9584201.49	17M
D	Agua residual de sifoneo	522988.98	9584169.87	17M
E	Sedimento del canal de desecho	522982.81	9584141.01	17M

(\*) Determinado con el Datum World Geodetic System 1984 (WGS 84)



**Figura 6. Ubicación de los puntos de muestreo del estanque muestreado (Google Earth, 2013)**

Se seleccionaron 10 langostinos con sintomatología de vibriosis (fluorescencia, manchas oscuras en el caparazón y ampollas terminales en pleópodos y urópodos) (Mora & López. 2007) que fueron guardadas en una bolsa nueva y 10 langostinos aparentemente sanos (sin fluorescencia en los urópodos) que fueron guardados en otra bolsa. Para el muestreo de agua de estanque de cultivo se ingresó hasta el centro del estanque con ayuda de un bote, se introdujo una botella de vidrio de 500 mL esterilizado y se tomó la muestra asépticamente a una profundidad de 20 cm aproximadamente. Se tomó una muestra de agua de la salida del “agua de sifoneo” en una bolsa nueva. Por último, la toma de muestra de sedimento fue realizada en el canal de drenaje bajo la misma condición anterior.



Todas las muestras fueron rotuladas y almacenadas en un contenedor térmico con refrigerantes para ser transportadas hasta el Laboratorio de Sanidad Acuícola del Instituto del Mar del Perú. Las muestras de langostinos fueron separadas en dos grupos denominados: “grupo sanos” y “grupo enfermos”. Luego se tomó registro del peso de cada individuo y se procedió a la disección.

Para la disección, se utilizaron pinzas estériles. La disección se inició con la extracción del *rostrum* del exoesqueleto de un individuo. A continuación, se realizó una biopsia de hepatopáncreas el cual fue almacenado en un microtubo de 1,5 mL. Finalmente, se cogió con una nueva pinza el origen del intestino para luego ser extraído y almacenado en otro microtubo de 1,5 mL. Todas las muestras fueron sometidas a este procedimiento y se obtuvieron como resultados: intestino del “langostinos sanos” (Figura 7A), hepatopáncreas “langostinos sanos” (Figura 7B), intestino de “langostinos enfermos” (Figura 7C) y hepatopáncreas “langostinos enfermos” (Figura 7D).



Figura 7. Toma de parámetros biométricos y disección de langostinos

#### 4.2.2. Diluciones seriadas

Se preparó solución salina estéril (SSE) al 0,9 % de NaCl (w/v) la cual sirvió como solvente para la preparación de las muestras, las cuales fueron realizadas en

microtubos estériles y obteniendo finalmente un aproximado de 1mL de volumen por cada tipo de muestra descrita en la Tabla 4.

**Tabla 4. Preparación de las muestras para las diluciones seriadas**

Tipo de muestra	Descripción	Soluta (muestra)		Solvente (SSE)
		Peso (g)	Volumen (μL)	Volumen (μL)
Sedimento	Canal de drenaje de estanque de cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i>	0,1	--	1000
Agua de sifoneo	Agua residual de fondo de estanque de cultivo	--	1000	--
Agua de estanque de cultivo	Columna de agua de estanque de cultivo intensivo de <i>L. vannamei</i> (20 cm profundidad)	--	1000	--
Hepatopáncreas de langostinos “sanos”	Pool de 10 individuos de <i>L. vannamei</i> con aparente estado de salud y sin presencia de urópodos fosforescentes	0,151	--	1000
Hepatopáncreas de langostinos “enfermos”	Pool de 10 individuos de <i>L. vannamei</i> con presencia de urópodos fosforescentes	0,214	--	1000
Intestino de langostinos “sanos”	Pool de 10 individuos de <i>L. vannamei</i> con aparente estado de salud y sin presencia de urópodos fosforescentes	0,344	--	1000
Intestino de langostinos “enfermos”	Pool de 10 individuos de <i>L. vannamei</i> con presencia de urópodos fosforescentes	0,484	--	1000

Se tomó una alícuota de 100 μL de cada tipo de muestra y se agregó en un microtubo que contenía 900 μL de SSE, luego se homogenizó la muestra y se volvió a tomar una alícuota para proceder con la siguiente dilución hasta llegar a la dilución requerida como se presenta en la Tabla 5.

#### **4.2.3. Selección de las diluciones para la siembra**

Se presenta el número de diluciones realizadas, señaladas con X, para cada tipo de muestra, y los de color anaranjado representan las diluciones utilizadas posteriormente para la siembra en medios de cultivo (Tabla 5).

**Tabla 5. Esquema de las diluciones realizadas a las muestras para la siembra en medios de cultivo**

Tipo de muestra	Diluciones								
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
Sedimento	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Agua de sifoneo	X	X	X	X	X				
Agua de estanque de cultivo	X	X	X						
Hepatopáncreas de langostinos “sanos”	X	X	X	X	X	X			
Hepatopáncreas de langostinos “enfermos”	X	X	X	X	X	X			
Intestino de langostinos “sanos”	X	X	X	X	X	X			
Intestino de langostinos “enfermos”	X	X	X	X	X	X			

#### 4.2.4. Siembra en medios de cultivo

Se sembraron las 19 diluciones seleccionadas (Tabla 5) en placas con agar TCBS preparado con agua de mar (sembradas por estriado) y placas con agar marino (sembradas por diseminación). Paralelamente, se sembraron aleatoriamente en 10 placas con agar TCBS al 2% (w/v) de NaCl y en otras 10 placas con agar TCBS al 3% (w/v) de NaCl con la finalidad de asegurar la obtención de una mayor riqueza de vibrios.

Todas las placas fueron incubadas a 30°C por 24 ± 2 h. En todos los casos existieron controles negativos correspondientes.

#### 4.2.5. Aislamiento y masificación en caldo de cultivo

Todos los medios incubados fueron revisados a las 24 h y se observó crecimiento en algunas placas de agar TCBS y agar marino. Se agruparon las placas en donde hubo crecimiento y se seleccionaron las colonias basados en criterios como: colonias

aisladas entre sí, características culturales, fuentes de procedencia y características fisiológicas.

Las colonias seleccionadas fueron sembradas en caldo TSB durante 24 h a 30°C con el objetivo de obtener como mínimo 2 g de biomasa por cepa sembrada.

#### **4.2.6. Identificación por pruebas bioquímicas miniaturizadas**

Se realizaron las pruebas de: asimilación de carbohidratos (celobiosa, manitol, manosa, sacarosa, arabinosa, galactosa), tipo de metabolismo (oxidativo y/o fermentativo), ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, crecimiento al 0% de NaCl, pruebas de Voges Proskauer, indol y citrato (Solis, 1996).

#### **4.2.7. Extracción de ADN**

Se tomaron los pesos de la biomasa de células bacterianas antes de proceder a la extracción de ADN, se trató de conseguir pesos de 15 mg aproximadamente, la metodología utilizada fue la extracción de ADN por el método DTAB/CTAB modificado previamente estandarizado.

#### **4.2.8. PCR para la región 16S rDNA**

Se preparó una mezcla maestra para 16 reacciones (14 muestras seleccionadas, *Vibrio cholerae* ATCC 14033 como control positivo y sólo mezcla maestra como control negativo) siguiendo las condiciones de PCR descritas en el ítem 4.1.2.3.

#### **4.2.9. Digestión con la enzima de restricción *RsaI***

Se preparó una premezcla usando 10X *FastDigest® Green Buffer* para 15 reacciones (14 digestiones y un control positivo *Vibrio cholerae* ATCC 14033), se adicionó 8 µl de ADN a cada microtubo para la digestión enzimática la cual duró 10 minutos en un baño maría a 37°C. La detención se realizó usando fenol/cloroformo. La detención se realizó usando fenol/cloroformo. La segunda corrida electroforética fue realizada de acuerdo al ítem 4.1.2.6.

#### **4.3. Identificación de cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio* aisladas de un cultivo de *Litopenaeus vannamei* por secuenciamiento de la región 16S rDNA**

##### **4.3.1. Purificación de los productos de PCR**

Se utilizó el método de purificación de productos de PCR en columna con un Kit de marca QIAGEN y se siguieron los pasos descritos en el inserto (QIAquick® Spin Handbook – PCR Purification Kit). Se realizó la purificación de los amplicones de las 4 cepas presuntivas (por pruebas bioquímicas) de pertenecer al género *Vibrio* (cepas: 03, 07, 16, 24) y la cepa referencial *Vibrio cholerae* ATCC 14033).

Se agregó el tampón PB a cada microtubo en una proporción de 1:5 (Producto de PCR/ Tampón PB). Luego se centrifugó a 13000 RPM durante 1 minuto. Seguidamente, se descartó el líquido colectado. Después, se realizó un lavado con 750 µL de Tampón PE. A continuación, se centrifugó a 13000 RPM durante 1 minuto. Luego, se pasó la columna del kit a un nuevo microtubo de 1,5 mL (Figura 8B).

Posteriormente, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de tampón de elución en el centro de la resina de la columna, se esperó un minuto y se centrifugó todo a 13000 RPM durante 1 minuto. Finalmente, el eluido resultante es un producto de PCR purificado (Figura 8A). El esquema resumido del proceso se presenta en la Figura 8C (Imagen tomada del inserto del kit de purificación de Producto de PCR: Quiagen - 2008).

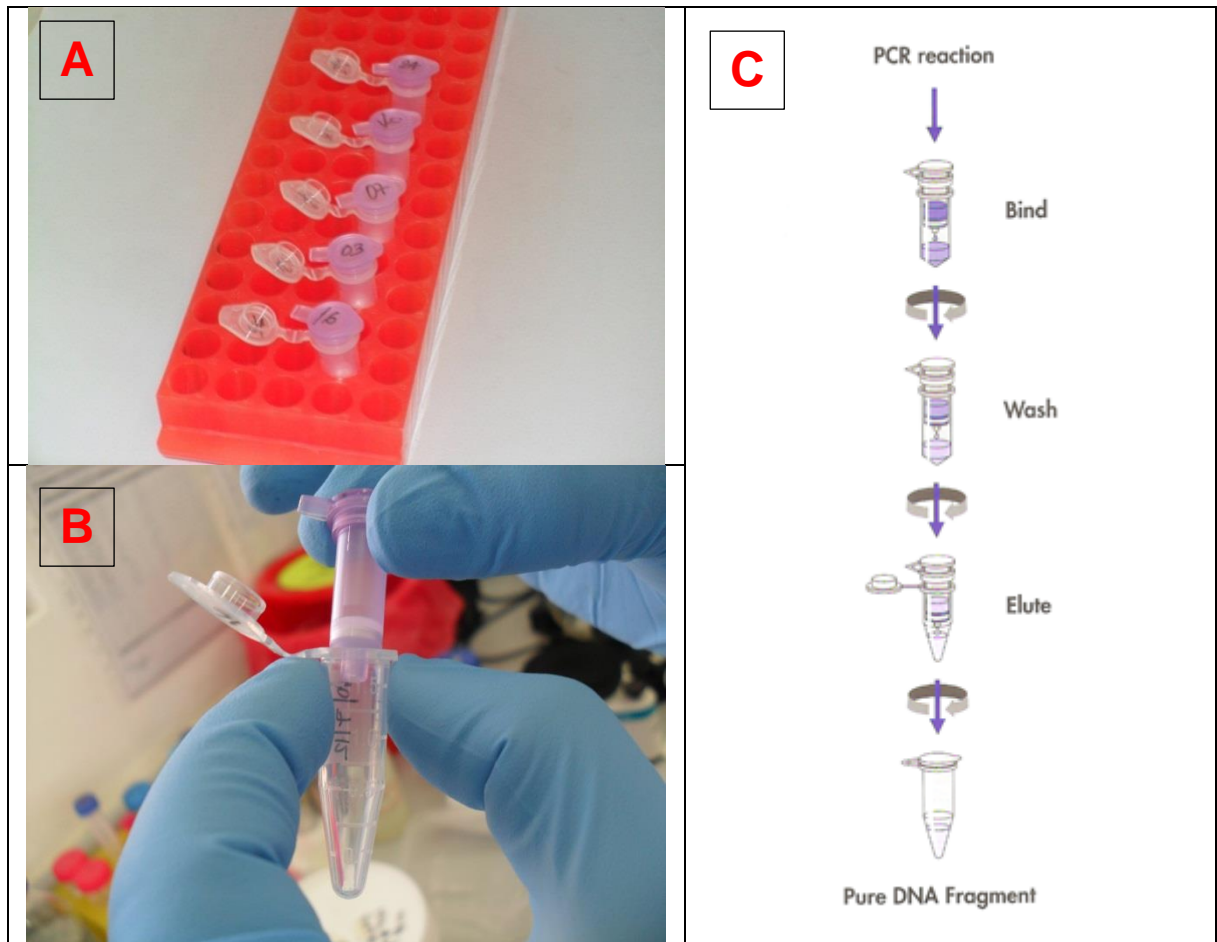


Figura 8. Purificación de productos de PCR de presuntos vibrios

#### 4.3.2. Cuantificación de los productos de PCR purificados

Se preparó un gel de agarosa al 1,2% de agarosa (w/v) y un tampón de corrida TAE 1X. Luego se inoculó 2  $\mu\text{L}$  de un patrón de peso molecular para cuantificar ADN del equipo (*Low Mass Ladder*) en el primer pocillo del gel, 4  $\mu\text{L}$  del patrón del mismo peso

molecular en los siguientes pocillos del gel, se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de producto de PCR purificado (cepa 03, 07, 16 y 24).

Se programó una corrida electroforética de una hora con 100V constantes. Luego, el gel fue sumergido en un baño de bromuro de etidio durante 15 min y el gel resultante fue introducido en el equipo documentador *Chemidoc XRS+* para la cuantificación del producto de PCR purificado.

#### 4.3.3. Secuenciamiento de la región 16S rDNA de los vibrios

Se realizó un secuenciamiento por terminador fluorescente con el kit *BigDye V.3.*, para ello se realizaron diluciones de los productos de PCR purificado con agua ultrapura para obtener una concentración de 2 ng/ $\mu\text{L}$  para un volumen de 40  $\mu\text{L}$ . Los *primers* tuvieron una concentración inicial de 50 pmol/ $\mu\text{L}$  y se realizó una dilución para obtener una concentración de 2,5 pmol/ $\mu\text{L}$ . La preparación de la mezcla maestra se realizó usando el kit de secuenciamiento *BigDye V 3.1* con las proporciones mostradas en la Tabla 6 y Tabla 7.

**Tabla 6. Proporción de reactivos de la mezcla maestra para la amplificación incompleta con el iniciador 8F**

Reactivos	Volumen para 1 reacción ( $\mu\text{L}$ )	Volumen para 5 reacciones ( $\mu\text{L}$ )
<i>BigDye v 3.1</i>	4	20
Tampón para secuenciamiento	2	10
Agua para secuenciamiento	7	35
Iniciador 8F: 2,5 pmol/ $\mu\text{L}$	2	10

**Tabla 7. Proporción de reactivos de la mezcla maestra para la amplificación incompleta con el iniciador 1510R**

Reactivos	Volumen para 1 reacción ( $\mu\text{L}$ )	Volumen para 5 reacciones ( $\mu\text{L}$ )
<i>BigDye v 3.1</i>	4	20
Tampón para secuenciamiento	2	10
Agua para secuenciamiento	7	35
Iniciador 1510R: 2,5 pmol/ $\mu\text{L}$	2	10

Se repartió 15 µL de mezcla maestra para secuenciamiento con el iniciador 8F. Luego, la mezcla maestra fue inoculada en 5 pocillos de la primera columna de la microplaca para secuenciamiento de 96 pocillos. Posteriormente, se añadió 5 µL de producto de PCR de cada cepa (*V.cho.*, 03, 07, 16 y 24), obteniendo al final un volumen total de 20 µL por pocillo.

Se repartió 15 µL de mezcla maestra para secuenciamiento con el iniciador 1510R. Luego, la mezcla maestra fue inoculada en 5 pocillos de la primera columna de la microplaca para secuenciamiento de 96 pocillos. Posteriormente, se añadió 5 µl de producto de PCR de cada cepa (*V.cho.*, 03, 07, 16 y 24), obteniendo al final un volumen total de 20 µL por pocillo.

Se preparó un control positivo para el secuenciamiento (*PGEM* Control) constituida de 4 µL de *BigDye* V.3.1, 2 µL de 5X *Sequencing Buffer*, 10 µL de agua para secuenciamiento, 2,5 µL de M13 *primer*, 1,5 µl de *PGEM template DNA*, obteniendo al final un volumen total de 20 µL por pocillo.

La microplaca fue introducida en un termociclador y el programa para la amplificación consistió de un ciclo inicial de denaturación completa a 96°C durante 1 minuto. Luego se corrieron 25 ciclos constituidos cada uno por una denaturación a 96°C por 10 segundos, alineamiento a 50°C por 5 segundos y elongación incompleta a 60°C por 4 minutos. Posteriormente, la amplificación, fue mantenida por el equipo a 4°C hasta el retiro de la microplaca. La amplificación incompleta aleatoria con los iniciadores, tuvo una duración de 2,5 h aproximadamente.

Terminada la amplificación, se agregó 80 µL de tampón de lavado "*Buffer Clean-up*" (Anexo 30) el cual estuvo almacenado a -20°C durante 30 minutos. Después, la microplaca fue cubierta con un adhesivo molde, se agitó en vortex y se dejó a temperatura ambiental durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 2000g



durante 30 minutos. A continuación, Se invirtió la placa y se centrifugó a 50g durante 10 segundos. Tras esto, se agregó 90 µL de etanol al 70%. Pronto, se centrifugó a 2000g durante 15 minutos. Seguidamente, se invirtió la placa y se centrifugó a 50g durante 10 segundos y se dejó secar en oscuridad por 30 segundos durante 3 h. Finalmente, se agregó 15 µL de formamida a cada pocillo y se incubó a 95°C durante 2 minutos, se puso en hielo durante 2 minutos más y luego se introdujo la placa en un analizador genético de 4 capilares (ABI Prism® 3100 – *Avant Genetic Analyzer*). El proceso se presenta de manera esquemática en la Figura 10.

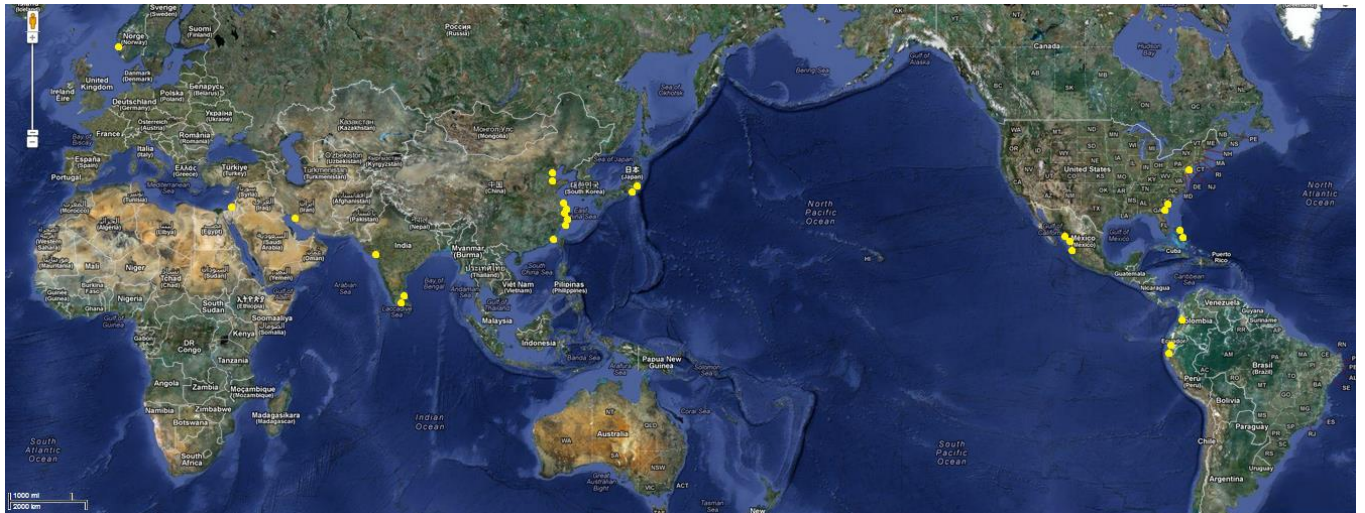
#### **4.3.4. Análisis bioinformático**

Los resultados de la electroforesis fueron almacenados en el programa *Run3100 – Avant Data Collection V.2.0*, se obtuvieron 11 archivos correspondientes a la región 16S rDNA de los vibrios peruanos en formato AB1 (VcF, VcR, 03F, 03R, 07F, 07R, 16F, 16R, 24F, 24R, PGEM). La base de datos fue analizada en el programa *Sequencing Analysis Software Version 5.1.1*.

A partir de las bases de datos resultantes del BLAST, se realizó una selección de secuencias 16S rDNA tomando en consideración los siguientes criterios:

1. Cobertura del 100% entre las cepas secuenciadas y las resultantes del BLAST.
2. Secuencias 16S rDNA de vibrios cuya especie se sospecha por los resultados de las pruebas bioquímicas.
3. Sólo se incluyeron los reportes publicados y que a su vez que contaban con las siguientes descripciones: nombre de la cepa, nombre científico completo, fuente de aislamiento, año de aislamiento o publicación, ubicación geográfica (se dio preferencia

a los reportes existentes de secuencias de países con salida al Océano Pacífico) esquematizadas en la Figura 9 en donde no se señalan las cepas que fueron aisladas a partir de muestras humanas.



**Figura 9. Distribución geográfica de los vibrios incluidos en el análisis filogenético**

Se realizó un análisis filogenético. Para el alineamiento de secuencias se utilizó el programa Clustal X2. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el Programa Mega V.5 (Tamura et al., 2011). Los árboles fueron diseñados por el método de Neighbour - Joining (Saitou & Nei, 1987) y la solidez de cada topología se comprobó por 1000 repeticiones Bootstrap (Felsenstein, 1985)

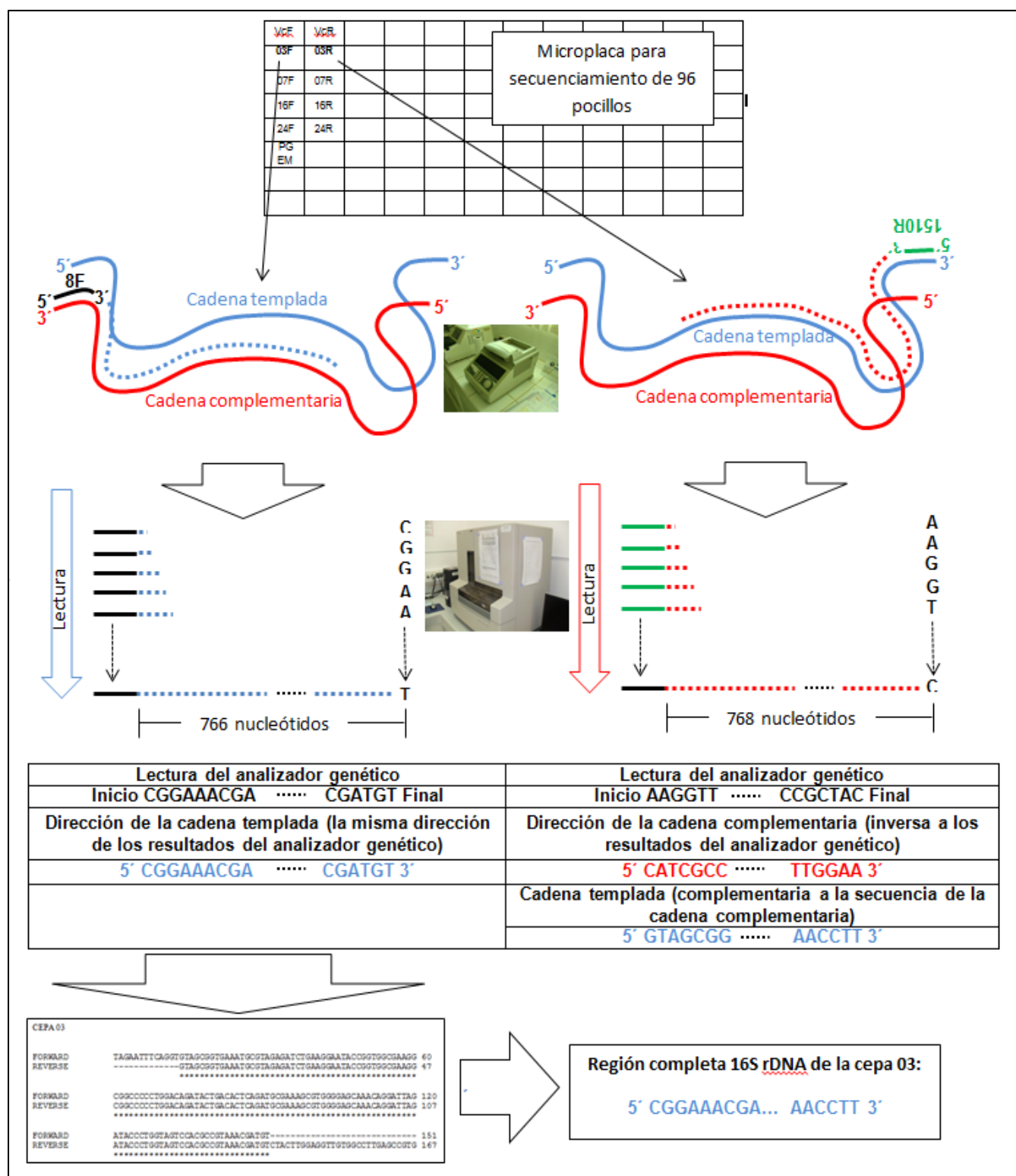


Figura 10. Esquema del secuenciamiento por terminación fluorescente para la cepa 03

#### **4.4. Diseño de la identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de *Litopenaeus vannamei* por ARDRA**

##### **4.4.1. Selección bioinformática de enzimas de restricción**

Se realizó una búsqueda de patrones de restricción diferenciales con ayuda del programa *NEBCutter* V.2.0 (Vincze *et al.* 2003). Para la elección de enzimas se tomaron criterios de selección como bandas diferenciales resultantes, mayores a 150pb tomando en consideración la estandarización de la segunda electroforesis y la discriminación de la especie o grupo con patrones de restricción únicos.

#### **4.5. Valoración diagnóstica bioinformática**

##### **4.5.1. Validación computacional del ARDRA para identificar el *Vibrio core group***

La valoración diagnóstica bioinformática fue soportada en resultados obtenidos de una simulación con ayuda del programa *NEBCutter* V.2.0. Los patrones obtenidos de la simulación de corte fueron comparados y se consideraron positivas a los que obtenían un patrón de restricción similar a los obtenidos con las cepas secuenciadas con un error de +/- 5 pb. Con el objetivo de identificar al *Vibrio core group* por ARDRA, se incluyeron en la validación bioinformática 44 cepas diferentes (las mismas que se utilizaron para construir el árbol filogenético) pertenecientes al género *Vibrio* constituidas de la siguiente manera: 7 de *Vibrio communis*, 6 de *Vibrio harveyi*, 6 de *Vibrio parahaemolyticus*, 3 de *Vibrio campbelli*, 1 de *Vibrio rotiferianus*, 2 de *Vibrio*

*alginolyticus*, 2 de *Vibrio natriegens*, 3 de *Vibrio mytili*, 1 de *Vibrio azureus*, 1 de *Vibrio chagasii*, 1 de *Vibrio neptunius*, 1 de *Vibrio coralliilyticus*, 1 de *Vibrio mediterranei*, 1 de *Vibrio nigripulchritudo*, 1 de *Vibrio diabolicus*, 1 de *Vibrio tubiashi*, 1 de *Vibrio xuii*, 1 de *Vibrio brasiliensis*, 1 de *Vibrio vulnificus*, 1 de *Vibrio shilonii*, 1 de *Vibrio aestuarianus* y 1 de *Vibrio splendidus* tal como se muestra en la Tabla 16.

#### **4.5.2. Validación computacional del ARDRA para identificar *Vibrio communis***

La valoración diagnóstica bioinformática fue soportada en resultados obtenidos de una simulación con ayuda del programa *NEBCutter* V.2.0. Los patrones obtenidos de la simulación de corte fueron comparados y se consideraron positivas a los que obtenían un patrón de restricción similar a los obtenidos con las cepas secuenciadas con un error de +/- 6 pb. Con el objetivo de identificar al *Vibrio core group* por ARDRA, se incluyeron en la validación bioinformática 44 cepas diferentes pertenecientes al género *Vibrio* (las mismas que para la valoración diagnóstica bioinformática del *Vibrio core group*).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Estandarización de condiciones de crecimiento para el género *Vibrio*

Los resultados del crecimiento de los vibrios aislados a partir de agua de mar y una cepa referencial (*Vibrio cholerae* ATCC 14033) se muestran en la Tabla 8, en donde la temperatura ambiental del laboratorio se encontró entre 28 y 30°C.

**Tabla 8. Influencia de la salinidad en el crecimiento de los vibrios**

Muestra	Medio de cultivo	Características culturales
<i>Vibrio</i> sp.(cepa de referencia)	TCBS preparado sin agregado de NaCl	Colonias amarillas intensas (sacarosa positivo)
Muestra de agua de mar	TCBS preparado con 3% de NaCl (w/v)	Colonias amarillas intensas (sacarosa positivo) y dos colonias pequeñas de color verde (sacarosa negativo)
	TCBS preparado sin agregado de NaCl	Colonias de color amarillo-cremosas (sacarosa positivo) y colonias de color verde (sacarosa negativo)
	TCBS preparado con 2% de NaCl (w/v)	Colonias solamente de color verde (sacarosa negativo)
	TCBS preparado con 3% de NaCl (w/v)	Colonias solamente de color verde (sacarosa negativo)

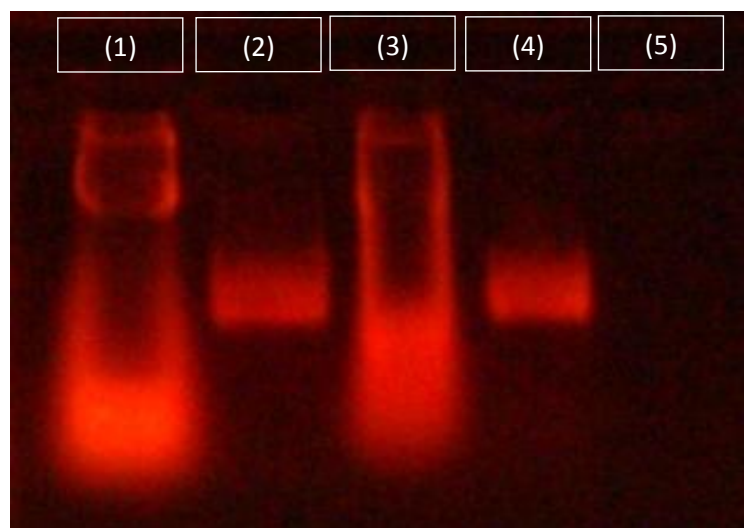
De acuerdo a estos resultados se acordó realizar placas preparadas con agar TCBS al 0%, 2% y 3% de NaCl (w/v) con agua destilada y con agua de mar así como también el uso de agar marino, todo con el propósito de aumentar la probabilidad de aislar una mayor riqueza de especies del género *Vibrio*.

## 5.2. Estandarización de la extracción de ADN

Se puede apreciar que con respecto a la calidad de extracción de ADN el método DTAB/CTAB es superior con respecto al método TNE Buffer y con respecto a cantidad de ADN extraído el método DTAB/CTAB demostró también ser superior (Tabla 9 y Figura 11). Por estos resultados, se eligió al método DTAB/CTAB para continuar con la estandarización del ARDRA.

**Tabla 9. Calidad de ADN extraído por el método DTAB/CTAB y "TNE Buffer"**

Método "TNE Buffer":	$\frac{\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm}}{\text{Absorbancia a } 280 \text{ nm}} = \frac{0,510 \text{ A}}{0,267 \text{ A}} = 1,91$
Método "DTAB/CTAB":	$\frac{\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm}}{\text{Absorbancia a } 280 \text{ nm}} = \frac{0,545 \text{ A}}{0,279 \text{ A}} = 1,95$



**Figura 11. Selección del método de extracción de ADN para la región 16S rDNA**

(1) Extracción de ADN de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 por el método "DTAB/CTAB". (2) Producto de PCR de *Vibrio* sp., usando ADN extraído por el método "TNE Buffer". (3) Extracción de ADN de *Vibrio* sp., por el método "TNE Buffer" (4) Producto de PCR de *Vibrio cholerae* ATCC 14033 usando ADN extraído por el método "DTAB/CTAB". (5) Control negativo.

### **5.3. Estandarización de la digestión enzimática para 16S rDNA de Vibrios**

#### **5.3.1. Prueba para determinar el mejor tampón para la reacción enzimática**

La primera experimentación de detención de la digestión enzimática tuvo el propósito de determinar que tampón era el mejor para que se llevara a cabo la reacción enzimática y que a su vez permita una buena resolución de bandas al someter el gel con luz ultravioleta en el transiluminador. Como resultado de este ensayo se pudo determinar que las mejores resoluciones se obtuvieron con el tampón *FastDigest® Green Buffer* (Figura 12 – comparación del carril 5 versus 6, 7 versus 8 y 9 versus 10) y sólo en la comparación del carril 2 versus 3 no se cumplió este comportamiento debido a que se perdió muestra durante la carga de la muestra (corrida electroforética durante 40 minutos a 90 V constantes en un gel de pequeño de 40 mL de volumen).

Luego de la primera experimentación con *HhaI* se logró como conclusión que es mejor utilizar *FastDigest® Green Buffer* para la digestión enzimática. Sin embargo dos nuevas interrogantes fruto de la primera experimentación fueron presentadas: ¿La utilización de *FastDigest® Green Buffer* presentará los mismos resultados con otra enzima de restricción? y ¿es el cloroformo, el fenol, la mezcla de los reactivos o sólo la baja temperatura lo que permite una mejor resolución al visualizarse en el transiluminador?, bajo estas dos nuevas interrogantes se realizó una segunda experimentación de detención. A su vez, con el objetivo de estandarizar el tamaño del gel y la concentración a la cual debe ser trabajado la última parte del ARDRA, se utilizó una cámara de electroforesis más grande para la segunda experimentación de detención (180 mL de volumen del gel de agarosa).



PCR de la región 16S rDNA	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14033			<i>Vibrio</i> sp.			<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14033		<i>Vibrio</i> sp.	
Enzima	-	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	-	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>
Tampón	-	FastDigest® Green Buffer	FastDigest®	-	FastDigest® Green Buffer	FastDigest®	FastDigest® Green Buffer	FastDigest®	FastDigest® Green Buffer	FastDigest®
Detención	-	Fenol/ cloroformo		-	Fenol/ Cloroformo		-20°C			
PM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

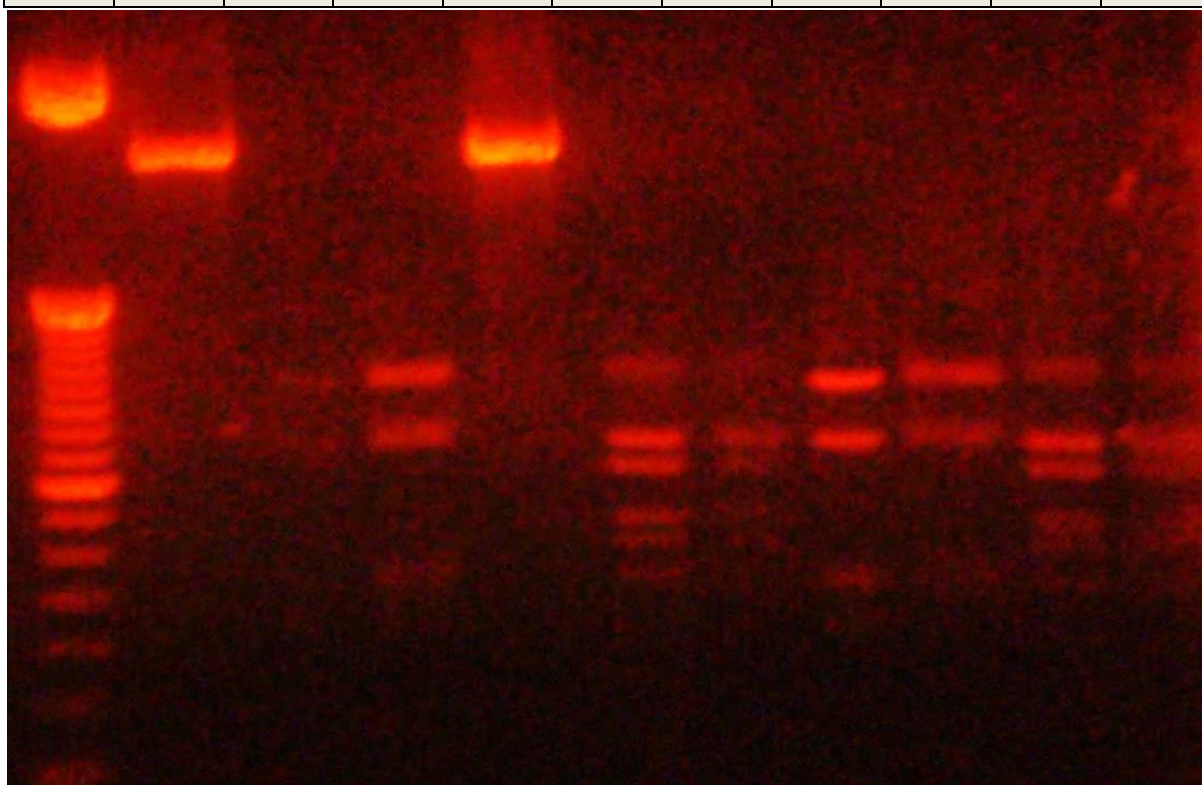


Figura 12. Estandarización de detención con una enzima de restricción

### 5.3.2. Prueba para determinar el mejor modo de detención enzimática

En la segunda experimentación se obtuvo a partir del producto de PCR de la región 16S rDNA de la cepa *Vibrio cholerae* ATCC 14033 una mejor visibilidad de bandas cuando se utilizaba fenol/cloroformo como reactivo para detener la digestión enzimática (carriles 1 y 3 versus los carriles 2 y 4 de la Figura 13), por otro lado la visibilidad de bandas es muy similar cuando la detención se realiza con sólo el cloroformo en comparación con baja temperatura (carriles 7 y 8 de la Figura 13), por último cuando la detención se realiza con sólo el fenol en comparación con baja temperatura (carriles 5 y 6 de la Figura 13) la visibilidad de bandas es muy similar.

La segunda experimentación fue realizada en un gel al 2% de agarosa durante 4 horas con 80 V (constante), con paradas de 5 minutos por cada hora y utilizando tampón de corrida nuevo. Se tomó como referencia que el amperaje (cambiante) inició con 75 mA y terminó con 77mA, (NOTA: se hizo otra prueba con 90V constantes durante 120 minutos y el gel se deformó por la alta temperatura, por ello se recomienda emplear 80V como límite de voltaje, para estas condiciones).

PCR de la región 16S rDNA	<b><i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14033</b>				<b><i>Vibrio</i> sp.</b>			
Enzima	<i>RsaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HhaI</i>
Tampón	<i>FastDigest® Green Buffer</i>							
Detención	Fenol/Cloroformo	-20°C	Fenol/Cloroformo	-20°C	Fenol	-20°C	Cloroformo	-20°C
PM	1	2	3	4	5	6	7	8



Figura 13. Estandarización de detención usando dos enzimas de restricción

#### 5.4. Características culturales y pruebas bioquímicas primarias

En el trabajo se realizaron siembras en diferentes medios de cultivo como se describió en la parte de metodología. Se tuvo en consideración para la selección de colonias sólo a los que dieron positivo para las pruebas de catalasa y oxidasa, por ser característica del género *Vibrio*. Las cepas seleccionadas se presentan de color celeste en la Tabla 10.

Tabla 10. Características fenotípicas de las 24 cepas aisladas y selección de 14 cepas diferenciales.

CÓDIGO DE LA CEPA	DESCRIPCIÓN DEL CULTIVO ANTES DE SER INCUBADO			DESCRIPCIÓN DE CARACTERÍSTICAS CULTURALES EN PLACA LUEGO DE 18h DE INCUBACIÓN						
	Tipo de agar utilizado y preparación	Fuente de aislamiento	Dilución sembrada	Forma	Elevación	Margen	Coloración/Asimilación de sacarosa	Diámetro (mm)	Catalasa	Oxidasa
01	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada	Sedimento del canal externo del estanque	$10^{-9}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	3	+	+
02	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	2	+	+
03	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	3	+	+
04	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	2	+	+
05	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada, con adición de 2% de NaCl (w/v)	Pool de hepatopáncreas del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-2}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	2	+	+
06	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Pool de hepatopáncreas del grupo de langostinos "sanos"	$10^{-5}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	3	+	+
07	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Pool de hepatopáncreas del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	2	+	+
08	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Pool de hepatopáncreas del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	2	+	+
09	Agar TCBS preparado con agua de mar	Pool de intestinos del grupo de langostinos	$10^{-5}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	1	-	+

	reposada	"sanos"								
10	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada con adición de 2% de NaCl (w/v)	Pool de intestinos del grupo de langostinos "sanos"	$10^{-5}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	2,5	+	+
11	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada con adición de 2% de NaCl (w/v)	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-2}$	circular	convexa	entera	amarillo crema	0,5	+	+
12	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada, con adición de 2% de NaCl (w/v)	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-2}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	3	+	+
13	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Columna de agua del estanque de cultivo	$10^{-3}$	irregular	umbonada	ondulada	amarillo opaco	3	+	+
14	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Columna de agua del estanque de cultivo	$10^{-3}$	circular	levantada	entera	Amarillo / +	4	+	+
15	Agar TCBS preparado con agua de mar reposada	Sedimento del canal externo del estanque de cultivo	$10^{-8}$	circular	levantada	entera	Amarillo / +	5	+	+
16	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada	Sedimento del canal externo del estanque	$10^{-9}$	circular	convexa	entera	Verde / -	0,5	+	+
17	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada	Sedimento del canal externo del estanque	$10^{-9}$	Irregular	convexa	ondulada	Amarillo / +	1,5	+	+
18	Agar TCBS preparado con agua destilada y desionizada, con adición de 2% de NaCl (w/v)	Agua de sifoneo (limpieza del fondo del estanque)	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Amarillo / +	3	+	+
19	Agar marino preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-5}$	circular	convexa	entera	Crema	2	+	+
20	Agar marino preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-5}$	circular	convexa	entera	Crema	1	+	+
21	Agar marino preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "enfermos"	$10^{-5}$	circular	convexa	entera	Crema	1	+	+
22	Agar marino preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "sanos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Crema	0,5	-	+
23	Agar marino preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "sanos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Crema	0,5	+	+
24	Agar marino preparado con agua destilada y desionizada	Pool de intestinos del grupo de langostinos "sanos"	$10^{-4}$	circular	convexa	entera	Crema	1	+	+

## 5.5. Pruebas bioquímicas miniaturizadas

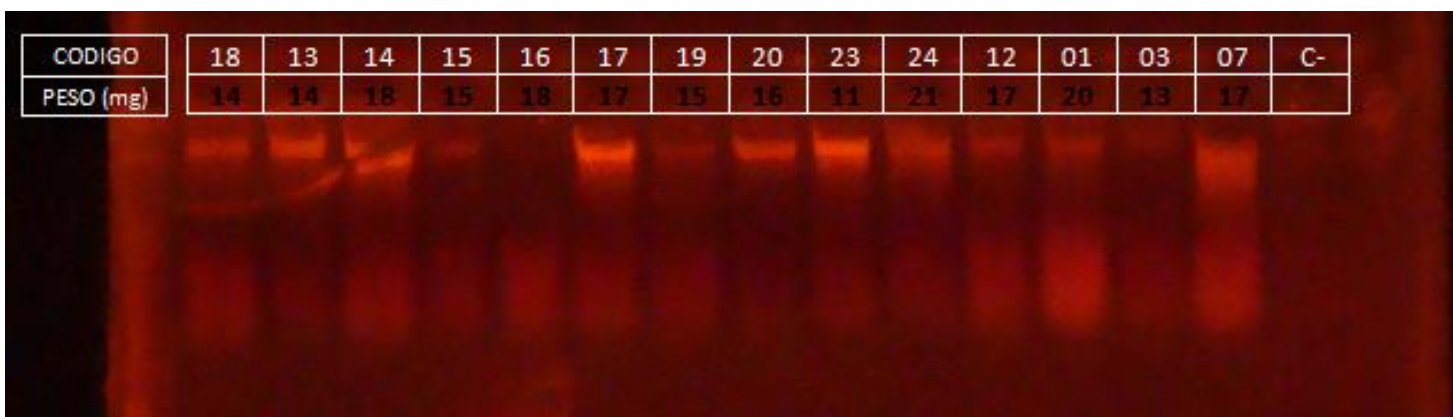
Se realizaron 14 pruebas bioquímicas adicionales para discriminar aún más las cepas aisladas y obtener cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio*. Se seleccionaron luego sólo a las cepas que dieron positivo para la pruebas de metabolismo oxidativo y fermentativo como se reporta en el Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey's (Garrity *et al.*, 2005), como se muestra en la Tabla 11 coloreadas de celeste. Adicionalmente se confirmó que las cepas candidatas dieron coloración Gram negativa.

## 5.6. Extracción de ADN

Se verificó la extracción de ADN por visualización en el transiluminador de las 14 cepas, en donde se incluían a las 4 candidatas de pertenecer al género *Vibrio* y se confirmó la presencia de ADN extraído en las 14 cepas bacterianas (Figura 14). La calidad de ADN extraído fue buena para 13 cepas (Tabla 12) (valores de  $A_{260}/A_{280}$ , cercanos a 1,8) (Ferdous *et al.*, 2012), excepto para la cepa 18 (Tabla 12).

Tabla 11. Pruebas bioquímicas miniaturizadas de las 14 cepas previamente seleccionadas y selección de 4 cepas candidatas.

Fuente de aislamiento	CÓDIGO	Asimilación de:						Metabolismo:		Ornitina descarboxilasa	Arginina dihidrolasa	Crec. en 0% de NaCl	Pruebas de:		
		Celobiosa	D - Manitol	D - Manosa	Sacarosa	L - Arabinosa	D - Galactosa	OF oxidativo	OF fermentativo				Voges proskauer	Indol	Citrato
	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 14033	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Agua de sifoneo	18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Columna de agua	13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Columna de agua	14	-	-	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Sedimento	15	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sedimento	16	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Sedimento	17	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Intestino enfermos	19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Intestino enfermos	20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Intestino sanos	23	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Intestino sanos	24	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Intestino enfermos	12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Sedimento	01	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	-	+	-
Intestino enfermos	03	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Hepatopáncreas enfermos	07	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	d	-	+	-



**Figura 14. Resultados de la extracción de ADN de 14 cepas seleccionadas (método DTAB/CTAB)**

**Tabla 12: Calidad de ADN extraído de las 14 cepas bacterianas seleccionadas por relación de absorbancias entre 260 y 280nm.**

CÓDIGO de CEPA	260nm	280nm	260nm/280nm
18	0,008	0,006	1,3
13	0,005	0,003	1,7
14	0,007	0,004	1,8
15	0,005	0,003	1,7
16	0,006	0,003	2,0
17	0,005	0,003	1,7
19	0,003	0,001	3,0
20	0,003	0,002	1,5
23	0,006	0,004	1,5
24	0,003	0,001	3,0
12	0,007	0,004	1,8
1	0,011	0,005	2,2
3	0,003	0,001	3,0
7	0,007	0,004	1,8



### 5.7. Producto de PCR para la región 16S rDNA

Como se observa en la Figura 15, se verifica la amplificación de la región 16S rDNA para las 14 cepas más el control positivo (*Vibrio cholerae* ATCC 14033) y se verifica también que no existió contaminación ya que no existió amplificación para el caso del control negativo.

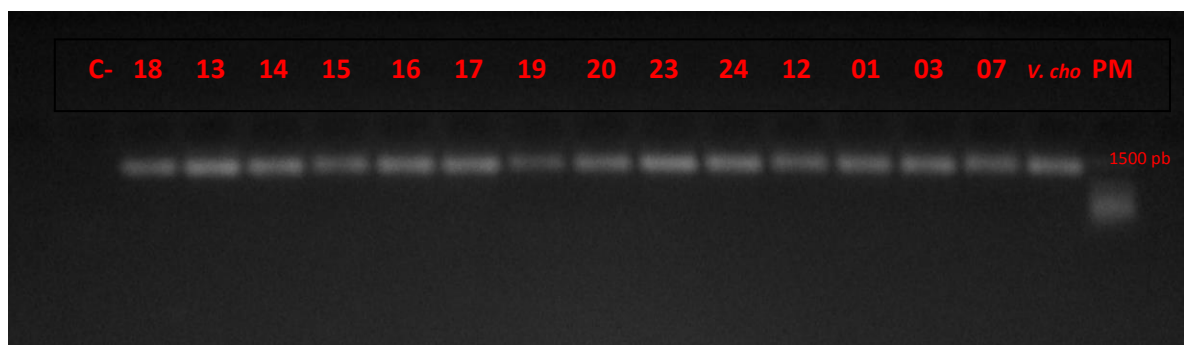


Figura 15. Productos de PCR de la región 16S rDNA de las 14 cepas seleccionadas

### 5.8. Aplicación del ARDRA en las cepas aisladas

La técnica ARDRA estandarizada fue aplicada a las 14 cepas aisladas (en donde se encuentran incluidas las 4 cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio* por pruebas bioquímicas).

Posteriormente, con los resultados del análisis filogenético y una simulación de corte con el programa *NEBCutter V.2.*, se comprobó que los patrones obtenidos fueron los mismos que los del programa para las 4 cepas candidatas del género *Vibrio* enmarcadas en las Figuras 16 y 17 (cuadros rojos).

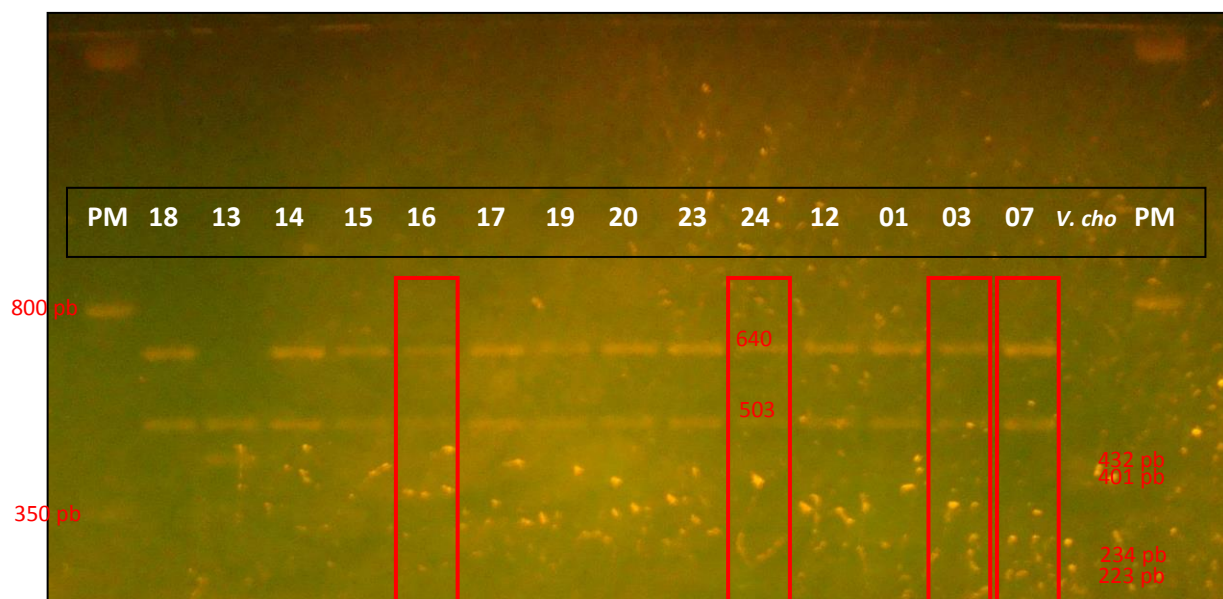


Figura 16. Productos de PCR luego de la digestión con la enzima *RsaI* para las 14 cepas seleccionadas

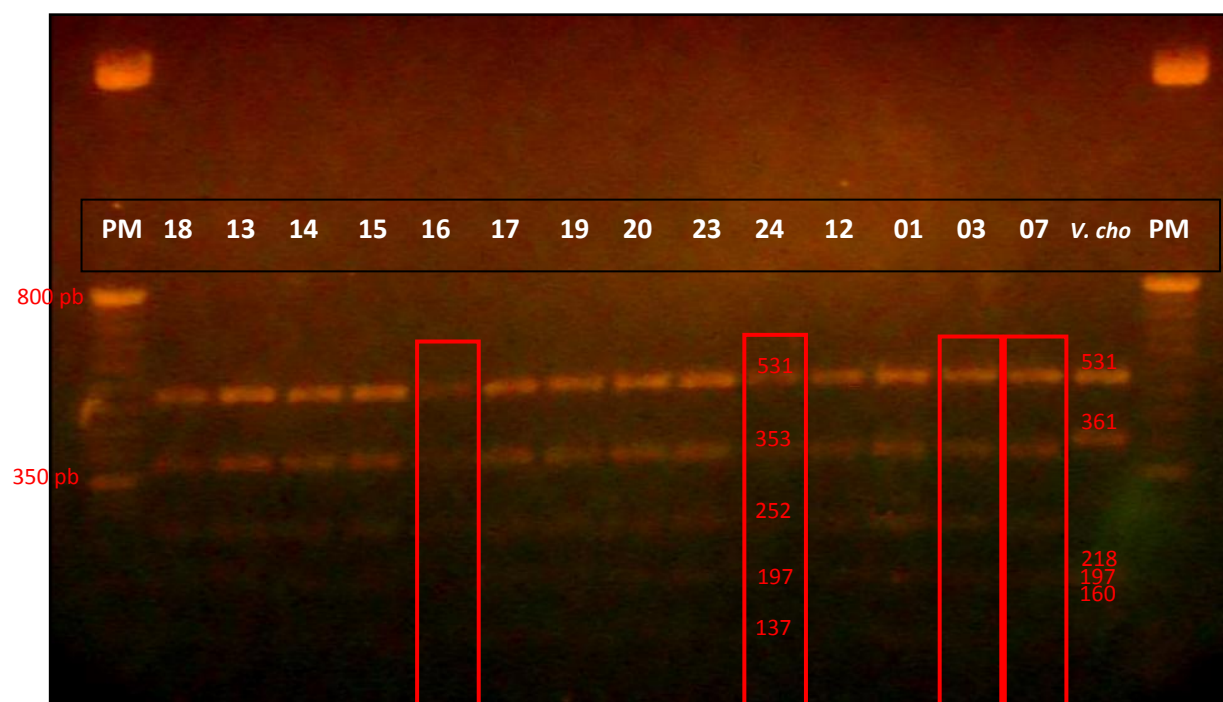


Figura 17. Productos de PCR luego de la digestión con la enzima *HhaI* para las 14 cepas seleccionadas

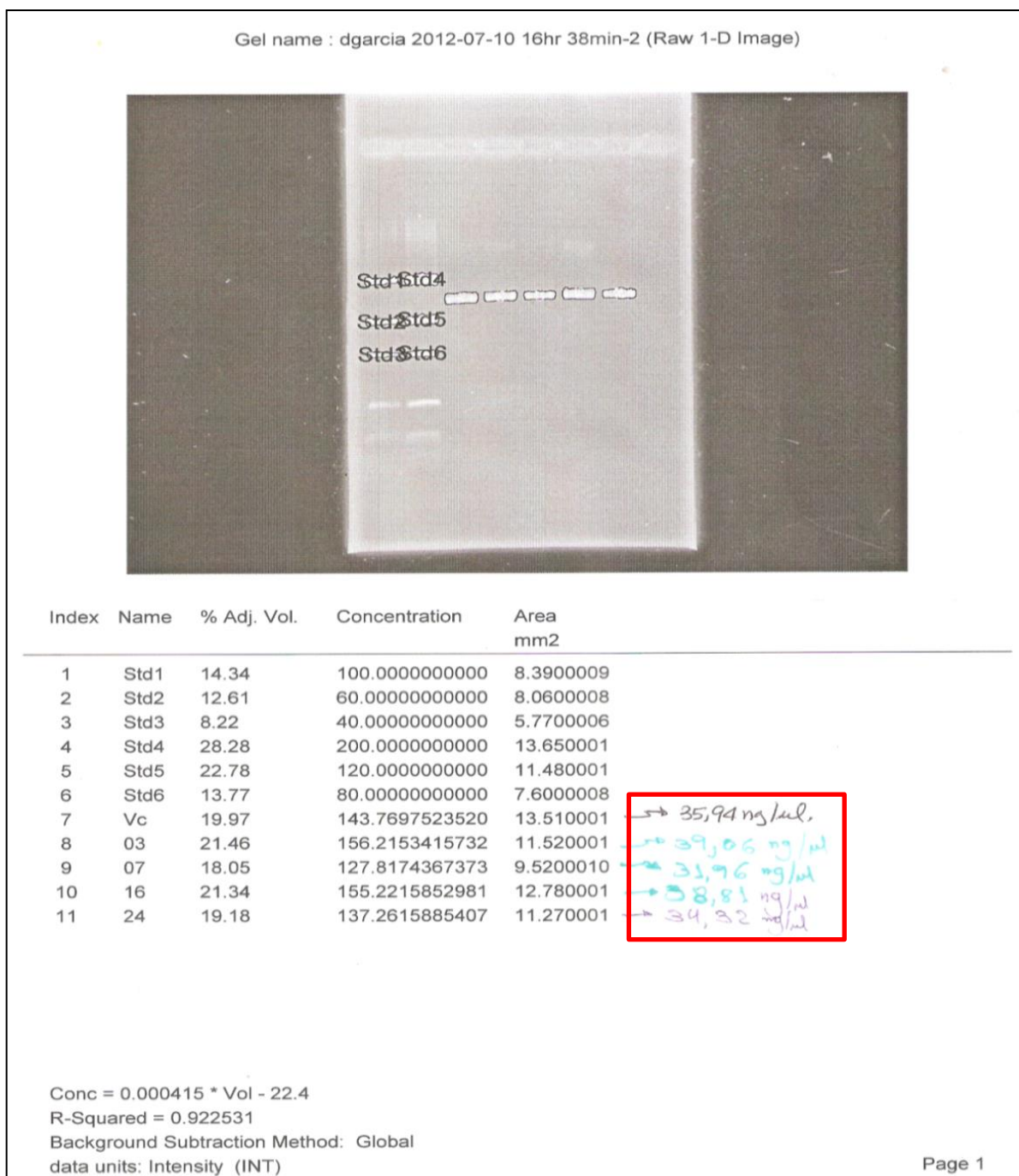
### **5.9. Cuantificación de los productos purificados de PCR de las 4 cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio***

La cuantificación de ADN de las 4 cepas candidatas se realizó con el equipo documentador *Chemidoc XRS+* con el cual se tomó la fotografía apropiada como se muestra en la Figura 18. El equipo determinó la cantidad de ADN por comparación de intensidad de luz captada en la imagen con respecto a cantidades de ADN conocidas a través del programa *Quantity One 1-D Analysis*. Las concentraciones obtenidas fueron halladas para 4 ng/μL, las concentraciones por cada microlitro están enmarcadas con un cuadro rojo.

### **5.10. Secuencias de la región génica 16S rDNA de bacterias presuntivas del género *Vibrio***

Se secuenció a la región 16S rDNA de las 4 cepas seleccionadas candidatas de pertenecer al género *Vibrio*. Los resultados se presentan en la Figura 19.

La cepa referencial *Vibrio cholerae* ATCC14033 fue secuenciada para corroborar la secuencia reportada en el GenBank y para utilizar estos resultados como *OUTGROUP* en el análisis filogenético. Los resultados se presentan en la Figura 19.



**Figura 18. Cuantificación de ADN de las 4 cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio* y la cepa referencial**

## 5.11. Análisis filogenético

### 5.11.1. Secuencias incluidas en el análisis filogenético

Una vez obtenido los resultados del secuenciamiento de la región 16S rDNA, estas se incluyeron para el análisis filogenético (presentadas en color rojo en la Tabla 13).

Se realizó un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de nucleótidos a la secuencia parcial 16S rDNA resultante del secuenciamiento para las 4 cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio* y se escogieron 16 secuencias resultantes del BLAST presentadas en color amarillo en la Tabla 13.

Se realizó una búsqueda de secuencias reportadas en el GenBank que correspondieran a las especies del *Vibrio core group* y que a su vez cumplan con los criterios de selección descritos en el Ítem 4.3.4., las cuales se presentan de color gris en la Tabla 13.

El resultado del secuenciamiento de la cepa referencial *Vibrio cholerae* ATCC 14033 fue utilizada en este análisis filogenético como *OUTGROUP* y se presenta de color celeste en la Tabla 13.

>CEPA\_Vibrio\_cholerae\_ATCC14033

CGGCAGCACAGAGGAACCTTTCTTCTTGGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCGGTAGAGGGGGATAACCAATTGGAAACGATGGCTAATACCGCA  
TAACCTCGCAAGAGCAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGCGTACCGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTG  
GTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGCT  
GTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCACTAGGGAGGAAGGTGGTTAAGTTAATACCTTAATCATTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA  
GCAGCCCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCTGGGCTCAACCTAGGAATCGC  
ATTTGAAACTGACAAGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGAT  
ACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCGTGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCTACTTTGGAGGTTGTACCTAGAGTCGTGGCTTTCCGAGC  
TAACGGGTAAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGTGCGAAGATTAAACTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAG  
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATCTAGCGGAGACGCTGGAGTGCCCTCGGGAGCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTGTGAAATGTTGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGTTCGACGACGTAAATGTTGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT  
CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGCGACGATACCGCAGGTGGAGCGAATCTCACAAGTACGTCGTAGTCCGATTGGAGTCT  
GCAACTCGACTCCATGCAATCGGAATCGTAGTAATCGCAAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGCTACACCATGGGAGTGGGATCGAA  
AGAAGCAGGTAGTTTAACCTT

>CEPA\_PERU\_03

CGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAACGATGGC  
TAATACCGCATAAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT  
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC  
ATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCACTGCTGAGGAAGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCATTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAAC  
TCGCTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGAGGGGTGCCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCTCAACC  
TCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC  
CCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCGTGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCTACTTTGAGGTTGTGGCTTTGAGCCGTG  
GCTTTCCGAGCTAACCGCTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAT  
GCAACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATCTKCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTCGCTAGGCTGTCTGACGCTGTTGTGA  
AATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGTTCGACGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAGGTGGGGACGAC  
GTCAGGTATCATGAGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGCGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAGTGGCTGTAGTCCGGA  
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGCTACACCATGGGAGT  
GGGCTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTT

>CEPA\_PERU\_07

GGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGRACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAACGATGGCTA  
ATACCGCATAAAYRCCTWCGGGTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATC  
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA  
TGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCACTGCTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT  
CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGAGGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCTCAACCT  
CGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGAGCGGTG-  
AATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGTCTACTTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCCGAGCTAAACCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCTCAAC  
GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA  
ACTCTGAGACAGGTGCTGCACTGCTGTGTAAGTTGTTGGTTAAGTTCGCGGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTTCGCAAGCACTTCG-  
GGTGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAG  
AGGGCRGCCAATTCGAGAGTAGGCGAATCCCAAAAGTGGCTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGAATG  
CCACGGTGAATCGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGATGGGCTGCAAAAGAAGTAGGTAGTTAACCTT

>CEPA\_PERU\_16

GGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGRACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAACGATGGCT  
AATACCGCATATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT  
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA  
ATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCACTGCTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATYRTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAATACGAGGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCTCAAC  
CTCGGAATTCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  
CCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCGTGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCTACTTTGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTG  
GCTTTCCGGAGCTAACCGCTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAT  
GCAACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGTGCTGTTGTGA  
AATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGTTCGACGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAGGTGGGGACGAC  
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCRGCCAACCTTCGCAAAAGTGAAGCGAATCCCAAAAGTGGCTGCTAGTCCGGA  
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGARTGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGCT

>CEPA\_PERU\_24

GGAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCAATTGGAACGATGGCT  
AATACCGCATATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT  
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACGTAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC  
ATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCACTGCTGAGGAAGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAAC  
TCGCTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGAGGGGTGCCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAGCCCGGGGCTCAACC  
TCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  
GCTTTCCGAGCTAACCGCTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAT  
GCAACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACGTGCTGTTGTGA  
AATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTGTTCGACGCGAGTAATGTCGGGAACCTCCAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAGGTGGGGACGAC  
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCRGCCAACCTTCGCAAAAGTGAAGCGAATCCCAAAAGTGGCTGCTAGTCCGGA  
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGARTGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGCT

Figura 19. Secuencias de la región 16S rDNA de los vibrios candidatos (CEPA\_PERU) y la cepa referencial de *Vibrio cholerae* ATCC 14033

**Tabla 13. Secuencias 16s rDNA de especies del género *Vibrio* incluidos en el análisis filogenético del presente estudio**

<b>Especie</b>	<b>Número de Acceso</b>	<b>Nombre de la cepa</b>	<b>Año de publicación</b>	<b>País de procedencia</b>
<i>Vibrio communis</i>	JF836181	P274	2011	EEUU
<i>Vibrio communis</i>	JF836180	F064	2011	EEUU
<i>Vibrio communis</i>	JQ665316.1	CSMCRI-1090	2012	India
<i>Vibrio communis</i>	JQ663917.1	VPMP47	2012	India
<i>Vibrio communis</i>	HM749745.1	CAIM1816	2010	México
<i>Vibrio communis</i>	GU078670	R-40900	2011	Brasil
<i>Vibrio communis</i>	AJ345066.1	LMG20370	2003	Ecuador
<i>Vibrio harveyi</i>	AB512470	AM11	2010	India
<i>Vibrio harveyi</i>	GU262992	090212	2010	China
<i>Vibrio harveyi</i>	GU974342	IS01	2010	Irán
<i>Vibrio harveyi</i>	GQ249053	VS1	2011	India
<i>Vibrio harveyi</i>	JQ434106	CAIM1792	2012	México
<i>Vibrio harveyi</i>	HM236045	S090801	2010	China
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FJ547093	MM21	2010	China
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EU652251	J-C2-34	2009	EEUU
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EU652250	J-C2-29	2009	EEUU
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EU652246	K1223	2009	EEUU
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	X74720	ATCC17802T	1995	Francia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	JN108879	qdfsVp001	2011	China
<i>Vibrio campbellii</i>	JQ801440	GSAU-15	2012	India
<i>Vibrio campbellii</i>	AB428925	LC1-943	2012	Japón
<i>Vibrio campbellii</i>	JN188422	464	2011	China
<i>Vibrio rotiferianus</i>	NR_042081	LMG 21460	2011	EEUU
<i>Vibrio alginolyticus</i>	JN188406	ZDS-6	2011	China
<i>Vibrio alginolyticus</i>	JN188404	NSA1	2011	China
<i>Vibrio natriegens</i>	JF792067	1D	2012	Colombia
<i>Vibrio natriegens</i>	JF431423	BPRIST034	2011	India
<i>Vibrio mytili</i>	NR_044911	Vmytili	2011	EEUU
<i>Vibrio mytili</i>	JQ663874	VPMP4	2012	India
<i>Vibrio mytili</i>	JQ663908	VPMP38	2012	India
<i>Vibrio azureus</i>	AB428897	LC2-005	2010	Japón
<i>Vibrio chagasii</i>	HM771345	LMG21353	2012	Noruega
<i>Vibrio neptunius</i>	NR_025476	LMG20536	2009	EEUU
<i>Vibrio coralliilycus</i>	JN039154	LMG 20984	2012	China
<i>Vibrio mediterranei</i>	X74710	CIP103203T	1995	Francia
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	HM771352	ATCC 27043	2012	EEUU
<i>Vibrio diabolicus</i>	X99762	HE800	2008	Francia
<i>Vibrio tubiashi</i>	X74725	ATCC 19109T	1995	Francia
<i>Vibrio xuii</i>	AJ316181	R-15052	2002	Bélgica
<i>Vibrio brasiliensis</i>	NR_025477	LMG 20546	2009	Brasil
<i>Vibrio vulnificus</i>	X76333	ATCC 27562	1994	EEUU
<i>Vibrio shilonii</i>	AF007115	AK-1	1997	Israel
<i>Vibrio aestuarianus</i>	X74689	ATCC 35048T	1995	Francia
<i>Vibrio splendidus</i>	X74724	ATCC 33125T	1995	Francia
<i>Vibrio communis</i>	-	Cepa 03	-	Perú
<i>Vibrio harveyi</i>	-	Cepa 07	-	Perú
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	Cepa 16	-	Perú
<i>Vibrio communis</i>	-	Cepa 24	-	Perú
<i>Vibrio cholerae</i>	-	ATCC14033	-	Perú

### 5.11.2. Árbol filogenético

Los árboles fueron diseñados siguiendo los parámetros descritos en la metodología (Ítem 4.3.4) se incluyeron en el análisis 48 secuencias (Tabla 13) realizando un alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a la región 16S rDNA, las distancias fueron computadas por el método *Jukes - Cantor*. Se utilizó como *OUTGROUP* a la secuencia 16S rDNA de la cepa *Vibrio cholerae* referencial secuenciada (Figura 20). Se puede apreciar que la especie *Vibrio cholerae* a pesar de encontrarse en el mismo género tiene poca similaridad en relación a las demás cepas del género *Vibrio* incluidas en el análisis. Se puede apreciar que la CEPA\_07\_PERU presenta una alta similaridad con el *cluster* correspondiente a la especie *Vibrio harveyi* con un 99% de similaridad. Las cepas: CEPA\_24\_PERU y CEPA\_03\_PERU presentaron una alta similaridad con el *cluster* correspondiente a la especie *Vibrio communis* con una similaridad de 99%. Por último la CEPA\_16\_PERU presentó una mayor similaridad con el *cluster* correspondiente a la especie *Vibrio parahaemolyticus*. Las cepas fueron identificadas como una especie correspondiente al *cluster* en donde fueron ubicadas como resultado del análisis filogenético de la región 16S rDNA (Figura 20).

### 5.12. Selección de enzimas de restricción por análisis bioinformático

Se encontraron 4 enzimas de restricción diferenciales entre *Vibrio harveyi* y *Vibrio communis*, 7 enzimas de restricción diferenciales entre *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio communis*, y por último 6 enzimas de restricción diferenciales entre *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* (Tabla 14 y Tabla 15).



**Tabla 14. Resultado del análisis de enzimas de restricción diferenciales entre los cuatro vibrios aislados**

	CEPA PERU 03 <i>Vibrio communis</i>	CEPA PERU 07 <i>Vibrio harveyi</i>	CEPA PERU 16 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CEPA PERU 24 <i>Vibrio communis</i>
CEPA PERU 03 <i>Vibrio communis</i>				
CEPA PERU 07 <i>Vibrio harveyi</i>	NheI/ BmtI/ BsmI			
CEPA PERU 16 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	BstI/ BmtI/ NheI/ EaeI/ Tsp45I/ NcoI/ BstXI	EaeI/ BsmI/ Tsp45I/ NcoI/ BstXI		
CEPA PERU 24 <i>Vibrio communis</i>		NheI/ BmtI/ BsmI	BstI/ BmtI/ NheI/ EaeI/ Tsp45I/ NcoI/ BstXI	

**Tabla 15. Selección de enzimas de restricción para la validación bioinformática**

Cepas de Vibrio	Enzimas de restricción								
	EcoNI	BstXI	BmtI	NheI	Tsp45I	NcoI	EaeI	BsmI	BtsI
CEPA 07 <i>Vibrio harveyi</i>	1106/287 /29	1359/63	NC	NC	1345/77	1352/70	NC	667/ 641/ 114	1119/ 303
CEPA 16 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1062/288	NC	NC	NC	NC	NC	1200/150	1311/ 39	946/ 304/ 100
CEPA 24 <i>Vibrio communis</i>	1106/288	1362/32	1210/184	1206/188	1348/46	1355/39	NC	1311/ 83	1090/ 304
<i>Vibrio azureus</i> AB428897	1047/251	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1274/ 24	931/ 267/ 100
<i>Vibrio campbellii</i> JQ801440	1093/ 240	NC	NC	NC	1299/ 34	1307/ 26	1152/ 181	1264/ 69	1077/ 256
<i>Vibrio harveyi</i> GU262992	1107/ 316 /26	1389/ 60	NC	NC	1375/ 74	1382/ 67	1227/ 222	1338/ 111	1117/ 332
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> EU652251		1402/ 9							1067/ 344
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> JN108879		1422/ 92							1150/ 364
<i>Vibrio natriegens</i> JF792067		1366/ 43							1101/ 308
<i>Vibrio splendidus</i> X74724		1427/ 41							1099/ 369
<i>Photobacterium phosphoreum</i> D25310.1		1392/ 73							1131/ 334

NC = No hay corte

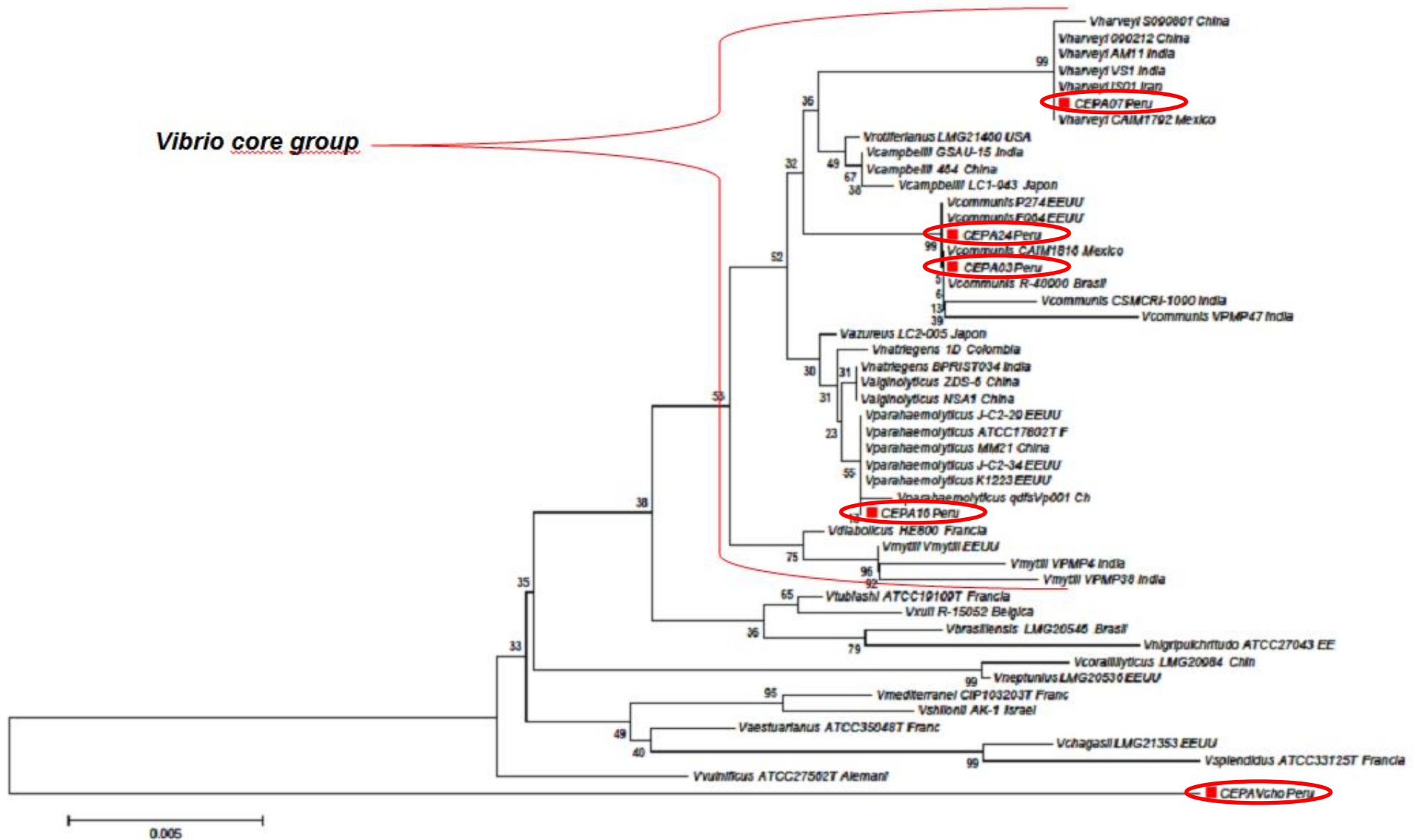


Figura 20. Árbol filogenético del *Vibrio* core group que incluye a los aislados en el presente trabajo

### 5.13. Valoración diagnóstica bioinformática

Se incluyeron 48 cepas en total para la valoración diagnóstica de la prueba (Tabla 16), 4 cepas aisladas de fuentes asociadas con la acuicultura de *L. vannamei* e identificadas por análisis filogenético de la región 16S rDNA y 44 cepas reportadas en el GenBank, que correspondieron a las mismas cepas utilizadas en la elaboración del árbol filogenético (con el objetivo de comprobar la utilidad de la prueba con especies del género *Vibrio* con alta similitud con respecto a las 4 cepas aisladas antes mencionadas).

**Tabla 16. Valoración diagnóstica bioinformática para el *Vibrio core group* y la especie *Vibrio communis***

Especies del género <i>Vibrio</i>	Código de Acceso	Para el <i>Vibrio core group</i>			Para <i>Vibrio communis</i>		
		Resultado confirmatorio	Patrón de restricción resultante de la digestión con <i>Bccl</i>	Resultados por ARDRA	Resultado confirmatorio	Patrón de restricción resultante de la digestión con <i>NheI</i>	<i>Vibrio communis</i> por ARDRA
<i>Vibrio communis</i> CEPA PERÚ 24	No reportado	+	562/ 442/ 289/ 101	-	+	1206/ 188	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CEPA PERÚ 16	No reportado	+	851/ 398/ 101	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio harveyi</i> CEPA PERÚ 07	No reportado	+	850/ 472/ 100	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio communis</i> CEPA PERÚ 03	No reportado	+	851/ 443/ 102	+	+	1207/ 189	+
<i>Vibrio communis</i>	JF836181	+	851/ 479/ 141	+	+	1246/ 225	+
<i>Vibrio communis</i>	JF836180	+	851/ 479/ 141	+	+	1246/ 225	+

<i>Vibrio communis</i>	JQ665316.1	+	857/ 460/ 114	+	+	1225/ 206	+
<i>Vibrio communis</i>	JQ663917.1	+	851/ 470/ 141	+	+	1110/ 216/ 136	+
<i>Vibrio communis</i>	HM749745.1	+	851/ 472/ 125	+	+	1230/ 218	+
<i>Vibrio communis</i>	GU078670	+	851/ 476/ 143	+	+	1248/ 222	+
<i>Vibrio communis</i>	AJ345066.1	+	851/ 476/ 143	+	+	1248/ 222	+
<i>Vibrio harveyi</i>	AB512470	+	851/ 505/ 164	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio harveyi</i>	GU262992	+	851/ 469/ 129	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio harveyi</i>	GU974342	+	851/ 529/ 113	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio harveyi</i>	GQ249053	+	852/ 475/ 134	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio harveyi</i>	JQ434106	+	851/ 468/ 166	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio harveyi</i>	HM236045	+	851/ 478/ 139	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FJ547093	+	851/ 505/ 161	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EU652251	+	851/ 419/ 141	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EU652250	+	851/ 419/ 141	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	EU652246	+	851/ 419/ 141	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	X74720	+	851/ 454/ 166	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	JN108879	+	851/ 502/ 161	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio campbellii</i>	JQ801440	+	851/ 429/ 53	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio campbellii</i>	AB428925	+	851/ 383/ 64	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio campbellii</i>	JN188422	+	851/ 465/ 96/ 8	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio rotiferianus</i>	NR_042081	+	851/ 476/ 141	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	JN188406	+	851/ 476/ 132	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	JN188404	+	851/ 472/ 134	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio natriegens</i>	JF792067	+	851/ 453/ 105	+	-	No hay corte	-

<i>Vibrio natriegens</i>	JF431423	+	851/ 459/ 161	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio mytili</i>	NR_044911	+	851/ 450/ 140	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio mytili</i>	JQ663874	+	851/ 435/ 140	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio mytili</i>	JQ663908	+	851/ 428/ 140	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio azureus</i>	AB428897	+	851/ 383/ 64	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio chagasii</i>	HM771345	-	1330/ 141	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio neptunius</i>	NR_025476	-	1327/ 141	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio coralliilycus</i>	JN039154	-	1327/ 138	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio mediterranei</i>	X74710	-	1304/ 166	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	HM771352	-	1329/ 141	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio diabolicus</i>	X99762	-	851/ 410/ 115	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio tubiashi</i>	X74725	-	851/ 291/ 166/ 128	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio xuii</i>	AJ316181	-	851/ 443/ 141	+	-	No hay corte	-
<i>Vibrio brasiliensis</i>	NR_025477	-	1363/ 141	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	X76333	-	1385/ 146/ 3/ 2	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio shilonii</i>	AF007115	-	1365/ 136	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio aestuarianus</i>	X74689	-	1270/ 157	-	-	No hay corte	-
<i>Vibrio splendidus</i>	X74724	-	980/ 322/ 166	-	-	1271/ 197	+

#### 5.14. Cálculo de la sensibilidad y especificidad del ARDRA para identificar especies del género *Vibrio* asociados al cultivo de *Litopenaeus vannamei*

La proporción de verdaderos positivos identificados por ARDRA del total de positivos por la prueba confirmatoria (Molinero, 2002) correspondieron al valor de sensibilidad de la prueba como figura en la Tabla 16 y Tabla 17, tanto para identificar a especies que se encuentren en el *Vibrio core group* como para identificar la especie *Vibrio communis*.

La proporción de verdaderos negativos identificados por ARDRA del total de negativos por la prueba confirmatoria (Molinero, 2002) correspondieron al valor de especificidad de la prueba como figura en la Tabla 16 y Tabla 17, tanto para identificar a especies que se encuentren en el *Vibrio core group* como para identificar la especie *Vibrio communis*.

**Tabla 17: Cálculo de los valores de sensibilidad y especificidad del ARDRA para el *Vibrio core group* y la especie *Vibrio communis***

		Prueba confirmatoria		Identificación del <i>Vibrio core group</i>	Identificación de la especie <i>Vibrio communis</i>
		Positivo	Negativo		
ARDRA	Positivo	a	b		
	Negativo	c	d		
<b>Sensibilidad (S)</b>				$S = \frac{a}{a + c} = \frac{34}{34 + 1}$	$S = \frac{a}{a + c} = \frac{9}{9 + 0}$
				S.100% = <b>97,1%</b>	S.100% = <b>100%</b>
<b>Especificidad (E)</b>				$E = \frac{d}{b + d} = \frac{10}{3 + 10}$	$E = \frac{d}{b + d} = \frac{38}{1 + 38}$
				E.100% = <b>76,9%</b>	E.100% = <b>97,4%</b>

### 5.15. Flujograma comparativo entre el ARDRA y el secuenciamiento de ADN para la identificación de especies bacterianas

Se presenta la comparación de tiempos y pasos requeridos para identificar especies en un flujograma del trabajo en la Figura 21.

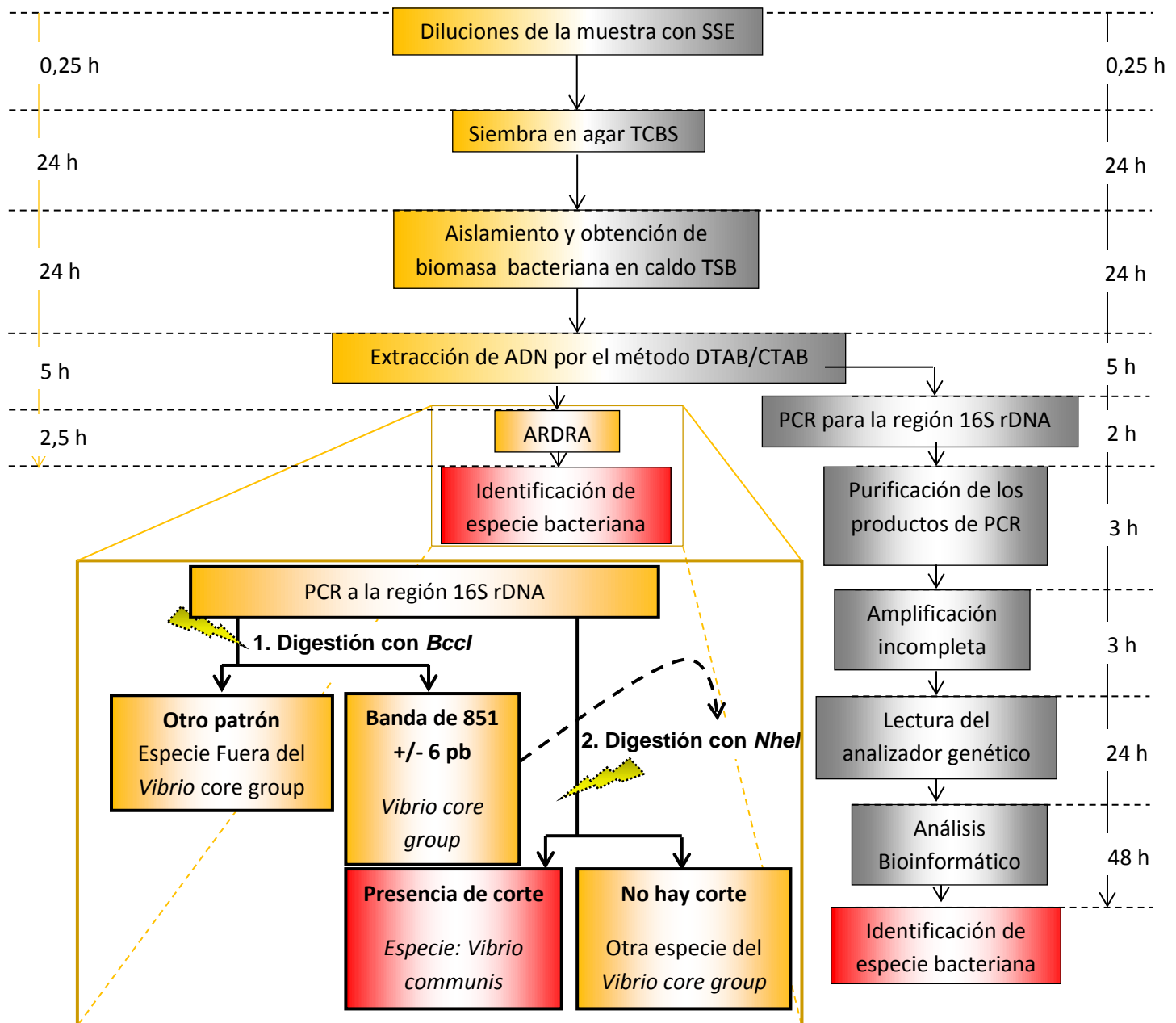


Figura 21. Flujograma para la identificación del *Vibrio core group* y la especie *Vibrio communis* por ARDRA

## VI. DISCUSIÓN

Para la adopción del método ARDRA, se basó en dos publicaciones en donde se trabaja con la enzima *RsaI* y *HhaI* por los cuales se obtuvieron buenos resultados en la obtención de patrones de restricción diferentes que permitían la determinación de especies del género *Vibrio*. Para el presente trabajo no se pudo encontrar diferencias en los patrones de restricción de las cepas aisladas posiblemente debido a que en los trabajos de Yoon *et al.*, 2003 en Korea del Sur y Kita-Tsukamoto *et al.*, 2006 en Japón, se trabajó con cepas del género *Vibrio* con un mayor nivel de diferencias en la secuencia 16S rDNA. En el presente trabajo las muestras fueron colectadas de un estanque de cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* en donde la temperatura es mantenida a más de 30°C y permanece casi constante, promoviendo de esta manera el crecimiento de bacterias con características fisiológicas similares, lo cual se ve reflejado en el grado de parentesco de los vibrios encontrados los cuales pertenecían a su vez al *Vibrio core group*. Este grupo de vibrios es conocido por presentar alta similaridad en sus secuencias 16S rDNA (Sawabe *et al.*, 2007).

Para la elección de enzimas utilizadas en la estandarización del trabajo se tuvo en cuenta que sean enzimas que requieran 4 nucleótidos ya que la probabilidad del número de cortes depende a su vez de la cantidad de nucleótidos que requiere la enzima para que escinda a la cadena de ADN (Vaneechoutte & Heyndrickx, 2001) y para discriminaciones interespecíficas se requerían de enzimas de restricción que provean de alta probabilidad de corte en la región 16S rDNA. Adicionalmente, se realizó una simulación de corte en el programa NEBCutter V.2.0 a un grupo de especies del género *Vibrio* (*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio*



*anguillarum*, *Vibrio campbellii* y *Vibrio splendidus*) reportadas en un trabajo de tesis en una zona geográfica cercana al departamento de Tumbes (Solis, 1996), debido a que no existían reportes sobre vibrios asociados al cultivo de langostinos en el departamento de Tumbes. Finalmente se escogieron 2 enzimas para utilizarlas en la estandarización del ARDRA (*RsaI* y *HhaI*).

Con las enzimas *RsaI* y *HhaI* se logró estandarizar la metodología y se corroboraron los patrones obtenidos con los que arrojaba el programa simulador de cortes con enzimas de restricción. Sin embargo estas enzimas no fueron suficientes para poder ser utilizadas en la identificación de los vibrios aislados en este trabajo, debido a que sus secuencias son muy parecidas y por tanto los patrones resultantes son los mismos.

Con las regiones 16S rDNA secuenciadas de cada cepa, se encontró que las enzimas *BclI* y *NheI* permiten discriminar al *Vibrio core group* y a la especie *Vibrio communis* descrita por Chimetto *et al.*, 2011.

En la práctica esto podría servir para identificar los casos de altas mortalidades en donde podría confirmarse si se trata de algún miembro del *Vibrio core group* patógeno para *Litopenaeus vannamei* como el *Vibrio harveyi*.

Con respecto a las pruebas bioquímicas se debe tener en cuenta que no deben ser utilizadas como el principal criterio de clasificación para estudios de taxonomía o propósitos de sistemática. Las pruebas bioquímicas representan una aplicación previa a los estudios taxonómicos o sistemáticos y también en la descripción fenotípica de nuevas especies (Noguerola & Blanch, 2008). Sin embargo, la utilidad de las pruebas bioquímicas

fue muy importante al servir como filtros en la búsqueda de cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio* antes de ejecutar las pruebas moleculares ya que de otro modo la identificación molecular sin el uso de pruebas bioquímicas de entrada puede conllevar a gasto de tiempo y dinero en vano.

Con respecto al proceso de secuenciamiento de la región 16S rDNA de las cepas candidatas de pertenecer al género *Vibrio* se obtuvieron buenos electroferogramas con un “*spacing*” alto y “*background*” alto al inicio y final del secuenciamiento de cada hebra de ADN estudiado. Las longitudes de amplificación fueron de 750pb aproximadamente a partir de los cuales sólo utilizamos las regiones con electroferogramas bien definidos. Para continuar con el análisis bioinformático se le dio la opción de inversa complementaria en el programa *Sequencing Analysis Software* Version 5.1.1 a todas las secuencias amplificadas con los iniciadores reversos. Con el objetivo de ensamblar las amplificaciones obtenidas tanto del iniciador directo (*Primer 8F*) e iniciador reverso (*Primer 1510R*) para la cepa 03, se realizó un alineamiento entre una cepa de *Vibrio cholerae* (*Accession Number*: Z21856.1) escogida del GenBank con la secuencia obtenida con el *primer 8F* y luego con la secuencia obtenida con el *primer 1510R* (Figura 10 como ejemplo). Luego se realizaron los alineamientos entre los nucleótidos finales de la secuencia obtenida con el iniciador 8F y los nucleótidos iniciales de la secuencia obtenida con el iniciador 1510R y se obtuvo una complementariedad total de 138pb con 100% de correspondencia (la alineación se presenta en la parte inferior de la Figura 10), consiguiendo de esta manera la secuencia 16S rDNA de la cepa 03. Se trabajó de forma análoga para las demás cepas y se obtuvieron correspondencias del 100% en la complementariedad de nucleótidos.

Para la selección de secuencias 16S rDNA de vibrios con los que se construyó el árbol filogenético se realizó un BLAST para la región 16S rDNA de cada cepa secuenciada.

Con respecto a otras metodologías de identificación rápida, se debe tener en consideración que para el ARDRA, los productos de PCR de la región 16S rDNA dan por resultado heterogeneidad en longitud entre las diferentes especies, ante esto se recurre al alineamiento de secuencias y un posterior corte que da por resultado secuencias con homogeneidad en longitud y de esta manera se identifica a la especie bacteriana. Sin embargo, el corte representa la pérdida de información que podría diferenciar a una especie de otra (Ho & Reddy, 2010). Ante esta problemática, el grupo de von Wintzingerode desarrolló una metodología de identificación rápida la cual consiste en hacer un PCR de la región 16S rDNA en donde los dTTP son sustituidos por dUTP y sólo el *primer forward* está biotinilado. Posteriormente, los productos de PCR son inmovilizados por atracción magnética al conjugado streptavidina-beads. Los productos son lavados y resuspendidos con glucosilasa de uracilo de ADN generando fragmentos más pequeños de ADN, después las muestras son eluidas y luego se digieren los productos de PCR por una glicosilasa de uracilo obteniendo fragmentos que son eluidos en microtubos. Finalmente las muestras son analizadas por MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Esta metodología tiene una duración de 2h después de realizado el PCR. Finalmente, el análisis computacional de los espectros obtenidos permiten la discriminación de especies bacterianas (Von Wintzingerode *et al.*, 2002). Ante las nuevas metodologías, probablemente el futuro próximo de identificación bacteriana esté basado en el diseño de identificaciones rápidas por espectrometría de masas soportadas en la identificación

bacteriana por MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*). Hasta que la inversión tecnológica (alta) sea asumida, el ARDRA representa una buena alternativa de identificación rápida.

Con respecto a tiempos requeridos para identificación de especies del género *Vibrio*, comparando la identificación por análisis filogenético y el ARDRA, ambas metodologías son dependientes del aislamiento y caracterización bioquímica inicial para obtener bacterias que podrían pertenecer al género *Vibrio*. A su vez la parte de extracción de ADN y amplificación por PCR son comunes en ambas metodologías. Sin embargo, si tomamos como punto de partida el momento en que se tienen productos de PCR de la región 16 S rDNA, entonces la identificación por ARDRA requeriría de 2,5 h para obtener resultados a nivel de especie, mientras que la identificación por análisis filogenético demandaría de 80 h aproximadamente (si se cuenta con un secuenciador en el mismo laboratorio), teniendo de esta manera la metodología ARDRA una ventaja en tiempo de 77,5 h (más de tres días) con respecto a la identificación por análisis filogenético.

La metodología ARDRA a pesar de ser mucho más rápida que la identificación por análisis filogenético no desplaza a esta en su utilidad ya que para el diseño del ARDRA se requiere en un primer momento del conocimiento de la secuencia 16S rDNA que se consigue con el secuenciamiento de dicha región génica, por ello la utilidad del ARDRA está más ligada a evitar gastos innecesarios y ganar tiempo en la identificación de especies de importancia. Como prueba diagnóstica rápida con alto grado de sensibilidad y especificidad.

Con respecto a la diversidad de vibrios encontrada en los estanques de engorde de *Litopenaeus vannamei*, se debe de tener presente que los 3 vibrios identificados pertenecen al *Vibrio core group*, grupo caracterizado por presentar alta similitud

existente entre las secuencias 16S rDNA de sus miembros (Dorsch *et al.*, 1992), lo cual refutaría la primera impresión que se tuvo de que probablemente existiría una alta riqueza de especies del género *Vibrio* en los estanques de cultivo intensivo de *L. vannamei* (basados en la turbidez del agua y por la cantidad de bacteria que crece en los medios generales de cultivo bacteriano). Los resultados nos hicieron replantear esta hipótesis sustentando ahora que el cultivo intensivo incrementaría la carga bacteriana pero disminuiría la riqueza de especies presente en el estanque debido a que la temperatura constante condicionaría un ambiente en el cual abunden bacteria con requerimientos ambientales similares.

La temperatura del agua del estanque condiciona la velocidad de crecimiento de los langostinos, el factor de conversión alimenticio (Wyban *et al.*, 1995) y la respuesta inmunitaria (Pan *et al.*, 2008) innata celular y humoral de estos invertebrados (Pope *et al.*, 2011), al hacer esto, indirectamente la temperatura, también condicionaría la existencia de una menor riqueza bacteriana pero probablemente una mayor abundancia de ciertos grupos. Como soporte a esta hipótesis tenemos por ejemplo que la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* identificada no fue aislada del estanque mismo, sino del sedimento del canal de salida de agua de los estanques, mientras que *Vibrio communis* y *Vibrio harveyi* (vibrios con mayor similaridad de la región 16S rDNA entre ellos) fueron aislados a partir de los langostinos en donde la temperatura corporal es la misma que la de la columna de agua debido a que estos animales no regulan su temperatura (Puente, 2009). Por estos resultados se propone que se desarrollen estudios sobre el nicho ecológico de los vibrios que se llevan a cabo en universidades del primer mundo (Materna *et al.*, 2012) ya que podrían tener una gran repercusión en el manejo que se le podría dar a los estanques de cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* en el Perú.

Sobre el rol de los vibrios identificados en el ciclo de nutrientes de los estanques de cultivo, se tiene reportado que *Vibrio harveyi* excreta por lo menos diez enzimas diferentes degradantes de la quitina (Svitil *et al.*, 1997), un homopolímero de N-acetil-D-glucosamina, la cual es una de las más grandes fuentes de glicoproteínas en los océanos (Rieman *et al.*, 2002). Además debido a que los vibrios se movilizan por flagelo se ha sugerido que contribuyen a los ciclos de la materia orgánica en ambientes acuáticos (Thompson *et al.*, 2004).

Con respecto a los vibrios como agentes causales de zoonosis deben de tenerse en cuenta que algunos vibrios son sólo patógenos de vertebrados e invertebrados acuáticos como *Vibrio tapetis* y *Vibrio anguillarum* y otros vibrios pueden causar enfermedades tanto en animales acuáticos como en humanos como el caso de *Vibrio algynolitycus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnisii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* (Austin, 2010), este hecho debe de tenerse muy en cuenta por el riesgo en la salud de los trabajadores de las langostineras, sobre todo las personas que están encargadas del sifoneo de los estanques (actividad en donde el trabajador ingresa en el estanque y está por largo tiempo limpiando el sedimento expuesto de esta manera a los vibrios) y también en las certificaciones sanitarias de los productos tanto de exportación como de importación.

Sobre efectos sinérgicos entre el mayor patógeno viral WSSV (White Spot Syndrome Virus) y los vibrios en contra de *Litopenaeus vannamei* se ha comprobado que una coinfección incrementa la mortalidad de los langostinos en comparación con las

infecciones artificiales con sólo el WSSV o sólo el vibrión (Phuoc *et al.*, 2008). Esta experimentación se realizó con un miembro del *Vibrio core group* (Chimetto *et al.*, 2011).

Se aisló una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* del sedimento de canal de la salida del agua (cepa\_16\_Perú) del estanque de cultivo, existen reportes sobre la relación interespecífica de parasitismo entre *Vibrio parahaemolyticus* y *Litopenaeus vannamei*, en donde se indica que esta especie afecta tanto a juveniles, adultos y reproductores de *Litopenaeus vannamei* (Gomez-Gil *et al.*, 2004) (Vandenbergue *et al.*, 1999), además se ha reportado que una coinfección WSSV – *Vibrio parahaemolyticus* desencadena una respuesta inmunitaria innata hepatopancreática y hemocítica (Ji *et al.*, 2011) lo que sugiere al personal de nuestra empresa colaboradora que tengan presente que un contacto de este sedimento con la columna de agua podría ocasionar vibriosis en los langostinos.

Se aisló una cepa de *Vibrio harveyi* a partir del pool de hepatopáncreas del “grupo de enfermos” (cepa\_07\_Perú). Se ha reportado que ciertas especies del género *Vibrio* son los principales patógenos bacterianos de *Litopenaeus vannamei* (Zhou *et al.*, 2012), la enfermedad causada por vibrios en *Litopenaeus vannamei* ha sido caracterizado por la aparición de manchas rojas brillosas localizadas en la región central del abdomen, opacidad en el músculo abdominal, anorexia, letargia y muerte (Soto-Rodriguez *et al.*, 2010). La respuesta inmunitaria del langostino blanco inicia al igual que en otros invertebrados con los PAMPs (*Pathogen – Associated Molecular Patterns*) y se ha elucidado por silenciamiento del gen respectivo con RNAi, que el LvToll (un tipo de PAMP) es un factor importante en la respuesta inmune innata a infecciones agudas provocadas por *Vibrio harveyi* pero no de WSSV (Wang *et al.*, 2010), estos resultados, en

complementación con los estudios de sinergia existentes entre otra especie de vibrio (también perteneciente al *Vibrio core group*) y el WSSV (Phuoc *et al.*, 2008) despiertan la hipótesis de que el virus WSSV y la bacteria *Vibrio harveyi* podrían tener un efecto sinérgico en contra de *Litopenaeus vannamei*.

Se aislaron dos cepas de *Vibrio communis* a partir del “pool” de intestino del “grupo de enfermos” (cepa \_03\_Perú) y del “grupo sanos” (cepa \_24\_Perú), no existen reportes sobre la relación interespecífica existente entre *L. vannamei* y la especie recientemente clasificada como *Vibrio communis* (Chimetto *et al.*, 2011). En lo que respecta a vibrios probióticos, se tiene reportado que ciertas especies del género *Vibrio*, como: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, y *Vibrio piscium* presentan características probióticas para *Litopenaeus vannamei* (Vandenberghe *et al.*, 1999). En el año 2010 un estudio de antagonismo en contra de vibrios patógenos concluyó que un vibrión (*Vibrio gazogenes*) tiene potencial probiótico para el control de enfermedades bacterianas en *Litopenaeus vannamei* (Thompson *et al.*, 2010). En esta investigación, las dos cepas bacterianas identificadas como *Vibrio communis*, fueron aisladas tanto de langostinos con sintomatología de vibriosis como de langostinos con aparente estado de salud. A su vez, por informes de la empresa langostinera colaboradora el estanque que se muestreo presentó un buen rendimiento al final de la cosecha, esto sólo sugiere mas no confirma, que las cepas de la especie *Vibrio communis* podrían funcionar como probióticos importantes para *Litopenaeus vannamei*.



## VII. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó la técnica ARDRA para condiciones del Laboratorio de Sanidad Acuicola del Instituto del Mar del Perú.
2. Se identificaron tres especies del género *Vibrio* (*Vibrio communis*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*) asociados con el cultivo de *Litopenaeus vannamei*.
3. Se reporta la presencia de la especie *Vibrio communis* en el Perú.
4. Se diseñó una metodología de identificación rápida para la especie *Vibrio communis* y el *Vibrio core group* utilizando ARDRA.
5. De acuerdo a los resultados de la evaluación diagnóstica bioinformática para la identificación por ARDRA, el *Vibrio core group* tiene una sensibilidad de 97,1% y una especificidad de 76,9 %, mientras que la identificación de *Vibrio communis* por tiene una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 97,4 %.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) en la identificación bacteriana debido a que esta metodología es aceptada internacionalmente por los especialistas en sistemática del género *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2006) y es más confiable que la identificación por el análisis de sólo la región 16S rDNA (Pascual *et al.*, 2010) (Sawabe *et al.*, 2007) (Thompson *et al.*, 2007) (Thompson *et al.*, 2005).
- Cubrir la necesidad de estudios de ecología microbiana utilizando el ARDRA como herramienta de monitoreo para evaluar perfiles completos de comunidades bacterianas para la conservación de ambientes naturales y seguimiento de comunidades microbianas de estanques en las langostineras.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUSTIN, Brian. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*. 2010, vol. 140, n° 3-4, p. 310-317.
- CRUZ, Yanis. GONZÁLES, Norma. RODRIGUEZ, María del Carmen. POZO, Maylee. PLASENCIA, Juana. Lesiones por patógenos bacterianos en *Litopenaeus Schmitti* de cultivo. En: III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. La Habana, Cuba, 2004 p. 511-518.
- CHIMETTO, Luciane. CLEENWERCK, Ilse. ALVES, Nelson. SILVA, Bruno. BROCCHI, Marcelo. WILLEMS, Anne. DE VOS, Paul. THOMPSON, Fabiano. *Vibrio communis* sp. Nov., isolated from the marine animals *Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011, vol. 61, p. 1-7.
- DORSCH, M. LANE, D. STACKEBRANDT, E. Towards a Phylogeny of the Genus *Vibrio* Based on 16S rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1992, vol. 42, n° 1, p. 58-63.
- FALSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach using the Bootstrap. *Evolution*. 1985, vol. 39, n° 4, p. 783-791.
- FAO, 1974. Inf.Pesca, (159) Vol.2:130 p. Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina. Volumen 2 - documentos de reseña. Montevideo, Uruguay, 26 de noviembre a 2 de diciembre de 1974.

- FAO 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 April 2006. [Citado 27 May 2013].
- FEIJÓ, Rubens. Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) sob condições de cultivo. Orientador: PhD. Rodrigo Maggioni. Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. Área de concentração Ciências Biológicas, BRASIL, 2009.
- FERDOUS. Jannatul, HANAFI, M. M, Rafii. MUHAMMAD, Kharidah. A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology*. 2012, vol. 11, n° 27, p. 6956 – 6964.
- GARRITY, George. BRENNER, Don. KRIEG, Noel. STANLEY, James. *BERGEY'S MANUAL® OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Second Edition. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Springer. 2005.*
- GOMEZ-GIL, Bruno. SOTO-RODRÍGUEZ, Sonia. GARCÍA-GASCA, Alejandra. ROQUE, Ana. VASQUEZ-JUAREZ, Ricardo. THOMPSON, Fabiano. SWINGS, Jean. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolated associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. 2004, vol. 150, n° 6, p. 1769-1777.
- HO, Yeng Peng and REDDY, P Muralidhar. Identification of Pathogens by Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2010, vol. 536, p. 525 – 536.

JI, Pei-Feng. YAO, Cui-Luan. WANG, Zhi-Yong. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. *Diseases of Aquatic Organism*. 2011, vol. 96, p. 9-20.

KITA-TSUKAMOTO, Kumiko. YAO, Katomi. KAMIYA, Akiko. YOSHIZAWA, Susumu. UCHIYAMA, Nami. KOGURE, Kazuhiro. WADA, Minoru. Rapid Identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. *FEMS microbiology letters*. 2006, vol. 256, n° 2, p. 298-303.

LIGHTNER, Donald. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011, vol. 106, p. 110-130.

MARSHALL, Steven. CLARK, Clifford. WANG, Guiqiang. MULVEY, Michael. KELLY, Michael. JOHNSON, Wendy. Comparison of Molecular Methods for Typing *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol. 37, n° 8, p. 2473-8.

MATERNA, Arne. FRIEDMAN, Jonathan. BAUER, Claudia. DAVID, Christina. CHEN, Sara. HUANG, Ivy. GILLENS, April. CLARKE, Sean. POLZ, Martin. ALM, Eric. Shape and evolution of the fundamental niche in marine *Vibrio*. *The International Society for Microbial Ecology - ISME Journal*. 2012, vol. 6, n° 12, p. 2168-77.

MOLINERO, Luis. Valoración de pruebas diagnósticas. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión. Liga Española para la lucha contra la Hipertensión Arterial. 2002, p. 1-7.

MONSALUD, Rosario. MAGBANUA, Fe. TAPAY, Lourdes. HEDREYDA, Cynthia. OLYMPIA, Minerva. MIGO, Veronica. KURAHASHI, Midori. YOKOTA, Akira.

Identification of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio* strains from shrimp and farms in the Philippines. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2003, vol. 49, p. 309 - 314.

MORA, Huáscar & LÓPEZ, Pablo. Valoración de la situación sanitaria del camarón *Litopenaeus vannamei* en puerto Morazán, Chinandega. Asesora: Lic. Yadira Mendoza. Monografía para obtener el grado de Médico Veterinario. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA (UNA). NICARAGUA, 2007.

NOGUEROLA, I & BLANCH, A. Identification of *Vibrio* spp. With a set of dichotomous keys. *Journal of applied microbiology*. 2008, vol. 105, n° 1, p. 175-85.

PASCUAL, Javier. MACIÁN, M. Carmen. ARAHAL, David R. GARAY, Esperanza. PUJALTE, María J. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010, vol. 60, p. 154-165.

PAN, Lu-Qing. HU, Fa-Wen. JING, Fu-Tao. LIU, Hui-Jie. The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2008, vol. 25, n° 1-2, p. 137-142.

PÉREZ, FARFANTE. Illustrated Key to Penaeoid Shrimps of Commerce in the Americas. *NOAA Technical Rerpots, NMFS 64*, 1988.

- POPE, Edward. POWELL, Adam. ROBERTS, Emily. SHIELDS, Robin. WARDLE, Robin. ROWLEY, Andrew. Enhanced Cellular Immunity in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after "Vaccination". *PLOS ONE*. 2011, vol. 6, n° 6, p. 309 – 314.
- PUENTE, Eleonora. Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura. Asesor: Dr. Silverio López y Dr. Alfonso Maeda. Tesis para el grado de Doctor en Ciencias Marinas. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL – CICIMAR. MÉXICO, 2009.
- RIEMANN, Lasse. & AZAM, Farooq. Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, vol. 68, n° 11, p. 5554 – 5562.
- RODICIO, María del Rosario & MENDOZA, María del Carmen. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004, vol. 22, n° 11, p. 81-87.
- PHUOC, L. H., CORTEEL, M., NAUWYNCH, H. J., PENSAERT, M. B., BROECK, W.V. D., SORGELOOS, P., & BOSSIER, P. Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. *Environmental Microbiology*. 2008, vol. 10, n° 10, p. 2718-2727.
- SAITOU, N. NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987, vol. 4, n° 4, p. 406-25.

- SAWABE, Tomoo. KITA-TSUKAMOTO, Kumiko. THOMPSON, Fabiano. Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology*. 2007, vol.189, n° 21, p. 7932-7936.
- SOLIS PAREDES, ARTURO. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica (ESPOL). Guayaquil – Ecuador, 1996.
- SOTO, Sonia. GOMEZ, Bruno. LOZANO, Rodolfo. “Bright-red” syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2010, vol. 92 p. 11-19.
- SVITIL, AI. CHADHAIN, S. MOORE, J. KIRCHMAN, D. *Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium Vibrio harveyi growing on different forms of chitin. Applied Environmental Microbiology*. 1997, vol. 63, p. 408-413.
- TAMURA, Koichiro. PETERSON, Daniel. PETERSON, Nicholas. STECHER, Glen. NEI, Masatoshi. KUMAR, Sudhir. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011, vol. 28, n° 10, p. 2731-9.
- THOMPSON, Fabiano. IIDA, Tetsuya. SWINGS, Jean. *Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004, vol. 68, n° 3, p. 403-431.
- THOMPSON, Fabiano. KLOSE, Karl. AVIB Group. Vibrio2005: the First International Conference on the Biology of Vibrios. *Journal of Bacteriology*. 2006, vol.188, n° 13, p. 4592-4596.



- THOMPSON, Fabiano. GEVERS, Dirk. THOMPSON, CC., DAWYNDT, Peter. NASER, Sabri. HOSTE, Bart. MUNN, CB. SWINGS, Jean. Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, n° 9, p. 5107-5115.
- THOMPSON, Fabiano. GOMEZ-GILL, Bruno. RIVEIRO, Teresa. SAWABE, Tomoo. Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are Distinct Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, n° 13, p. 4279-4285.
- THOMPSON, J., GREGORY, S., PLUMMER, S., SHIELDS, R. ROWLEY, A. An *in vitro* and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp., as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, vol. 109, p. 1177-1187.
- VANDENBERGUE, Johan. VERDONCK, Linda. ROBLES-ARZARENA, Rocio. RIVERA, Gabriel. BOLLAND, Annick. BALLADARES, Marcos. GOMEZ-GILL, Bruno. CALDERON, Jorge. SORGELOOS, Patrick. SWINGS, Jean. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probionts. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65, n° 6, p. 2592-2597.
- VANEECHOUTTE, Mario. HEYNDRICKX, Marc. Application and Analysis of ARDRA Patterns in Bacterial Identification, Taxonomy and Phylogeny. En: DIJKSHOORN, Lenie. TOWNER, Kevin. STRUELENS, Marc. New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data. 2001, p. 211-247.

- VINCZE, Tamas. POSFAI, Janos. ROBERTS, Richard. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol. 31, n° 13, p. 3688-3691.
- VON WINTZINGERODE, Friedrich. BOCKER, Sebastian. SCHLOTELBURG, Cord. CHIU, Norman. STORM, Niels. JURINKE, Christian. CANTOR, Charles. GOBEL, Ulf. VAN DEN BOOM, Dirk. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: A tool for rapid bacterial identification. *PNAS*. 2002, vol. 99, n° 10, p. 7039-7044.
- WYBAN, James. WALSH, William. GODIN, David. *Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (Penaeus vannamei)*. *Aquaculture*. 1995, vol. 138, n° 1-4, p. 267-279.
- YOON, Young-Jun. IM, Kyung-Hwan. KOH, Young-Hwan. KIM, Seong-Kon. KIM Jung-Wan. Genotyping of Six Pathogenic *Vibrio* Species Based on RFLP of 16S rDNAs for Rapid Identification. *The Journal of Microbiology*. 2003, vol. 41, n° 4, p. 312-319.
- ZHOU, Xu-xia. WANG, Yan-bo. LI, Wei-fen. *Effect of probiotic on larvae shrimp (Penaeus vannamei) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities*. *Aquaculture*. 2009, vol. 287, n° 3-4, p. 349-353.
- ZHOU, Junfang. FANG, Wenhong. YANG, Xianle. ZHOU, Shuai. HU, Linlin. LI, Xincang. Qi, Xinyong. SU, Hang. XIE, Layue. A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strains Is Associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *PLoS one*. 2012, vol. 7, n° 2, p. 1-6.

## X. ANEXOS

### Anexo 01. Caldo Trypticase de Soja (TSB)

Suspender 30 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar y luego esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Composición:	g/L
Triptona.....	17,0
Peptona de soja.....	5,0
Dextrosa.....	2,5
Glucosa.....	5,0
Cloruro de Sodio.....	5,0
Fosfato dipotásico.....	2,5
pH (7,3 ± 0,2)	

### Anexo 02. Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sales biliares, Sacarosa)

Suspender 88 g del medio en un litro de agua destilada, calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. No esterilizar en autoclave.

Composición:	g/L
Extracto de levadura.....	5,0
Peptona de carne.....	5,0
Tripteína.....	5,0
Citrato de sodio.....	10,0
Tiosulfato de Sodio.....	10,0

Bilis de Buey.....	8,0
Sacarosa.....	20,0
Cloruro de Sodio.....	10,0
Citrato férrico.....	1,0
Azul de bromotimol.....	0,04
Azul de timol.....	0,04
Agar.....	15,0
pH (8,6 ± 0,2)	

### **Anexo 03. Agar Marino**

Suspender 55.2 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar y luego esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Composición:	g/L
Cloruro de sodio.....	19,4
Cloruro de magnesio.....	8,8
Peptona.....	5,0
Sulfato de sodio.....	3,24
Cloruro de Calcio.....	1,8
Extracto de levadura.....	1,0
Cloruro de Potasio.....	0,55
Bicarbonato de Sodio.....	0,16
Citrato férrico.....	0,1
Bromuro de potasio.....	0,08
Cloruro de Estroncio.....	0,034

Ácido bórico.....	0,022
Fosfato disódico.....	0,008
Silicato de sodio.....	0,004
Fluoruro de sodio.....	0,0024
Nitrato de amonio.....	0,0016
Agar.....	15,0
pH (7,6 ± 0,2)	

#### **Anexo 04. Agar BHI (*Brain Heart Infusion*)**

Suspender 52 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar y luego esterilizar a 121°C por 15 minutos. Agregar 10% (w/v) de glicerol para el caso de los ceparios.

Composición:	g/L
Mezcla de peptona.....	19,4
Infusión corazón vacuno.....	8,8
Infusión de cerebro de ternera.....	5,0
Dextrosa.....	3,24
Fosfato disódico.....	1,8
Cloruro de Sodio.....	1,0
Agar bacteriológico.....	0,55
pH 7,4 ± 0.2 a 25°C	

#### **Anexo 05. Prueba de Catalasa**

Se toma un pequeño inóculo de la colonia en una lámina portaobjetos y se agrega una gota de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la presencia de burbujas indica un resultado positivo.

#### **Anexo 06. Prueba de Oxidasa**

Se toma un pequeño inóculo de la colonia aislada y se siembra el repique en una placa de agar TSA, luego agregar una gota del reactivo A y una gota del reactivo B, la presencia de coloración azul y/o morado en la superficie de la colonia indica un resultado positivo.

Reactivo A:

$\alpha$ -naftol..... 0,1 g

Alcohol absoluto..... 10 mL

Reactivo B:

N,N-dimetil-1,4-Fenilendiamonio diclorhidrato..... 0,1 g

Agua destilada..... 10 mL

#### **Anexo 07. Prueba de asimilación de celobiososa**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en un medio basal que contiene el carbohidrato celobiososa, el cambio de coloración de verde a amarillo (24h de incubación a 30°C) indica un resultado positivo.

NOTA: La celobiososa no debe ser autoclavada sino filtrada, para obtener 25 mL se mezcla lo siguiente:

Celobiosa al 10% (w/v) en 2,5 mL de agua destilada y luego filtrada.

0,235g de medio basal OF en 22,5 mL de agua destilada autoclavada.

Mezclar antes de que se solidifique el agar y almacenar en un frasco estéril en donde se llevará a cabo la prueba.

#### **Anexo 08. Prueba de asimilación de sacarosa**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en un medio basal que contiene el carbohidrato Sacarosa, el cambio de coloración de verde a amarillo (24h de incubación a 30°C) indica un resultado positivo.

NOTA: La sacarosa no debe ser autoclavada sino filtrada, para obtener 25 mL se mezcla lo siguiente:

Sacarosa al 10% (w/v) en 2,5 mL de agua destilada y luego filtrada.

0,235g de medio basal OF en 22,5 mL de agua destilada autoclavada.

Mezclar antes de que se solidifique el agar y almacenar en un frasco estéril en donde se llevará a cabo la prueba.

#### **Anexo 09. Prueba de asimilación de L-arabinosa**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en un medio basal que contiene el carbohidrato L-arabinosa, el cambio de coloración de verde a amarillo (24h de incubación a 30°C) indica un resultado positivo.

NOTA: La L-arabinosa no debe ser autoclavada sino filtrada, para obtener 25 mL se mezcla lo siguiente:

L-arabinosa al 10% (w/v) en 2,5 mL de agua destilada y luego filtrada.

0,235g de medio basal OF en 22,5 mL de agua destilada autoclavada.

Mezclar antes de que se solidifique el agar y almacenar en un frasco estéril en donde se llevará a cabo la prueba.

#### **Anexo 10. Prueba de asimilación de D-manitol**

Suspender 9,8 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. A 100 ml de base estéril, agregar 10 ml de la solución estéril de D-manitol al 10% (alternativamente agregar el hidrato de carbono antes de esterilizar y autoclavar a 118°C durante 10 minutos).

#### **Anexo 11. Prueba de asimilación de D-manosa**

Suspender 9,8 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. A 100 ml de base estéril, agregar 10 ml de la solución estéril de D-manosa al 10% (alternativamente agregar el hidrato de carbono antes de esterilizar y autoclavar a 118°C durante 10 minutos).

#### **Anexo 12. Prueba de asimilación de D-galactosa**

Suspender 9,8 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. A 100 ml de base estéril, agregar 10 ml de la solución estéril de D-galactosa al 10% (alternativamente agregar el hidrato de carbono antes de esterilizar y autoclavar a 118°C durante 10 minutos).



### **Anexo 13. Prueba de metabolismo oxidativo**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en un medio basal que contiene el carbohidrato Glucosa, el cambio de coloración de verde a amarillo (24h de incubación a 30°C) indica un resultado positivo.

D (+) Glucosa.....	10 g
Medio basal OF.....	0,94 g
Agua destilada.....	100 mL

### **Anexo 14. Prueba de metabolismo fermentativo**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en un medio basal que contiene el carbohidrato Glucosa, agregar seguidamente una capa de aceite vegetal hasta cuidando que no exista contacto entre el aire del medio ambiente con la cepa sembrada. El cambio de coloración de verde a amarillo (24h de incubación a 30°C) indica un resultado positivo.

D (+) Glucosa.....	10 g
Medio basal OF.....	0,94 g
Agua destilada.....	100 mL

### **Anexo 15. Ornitina descarboxilasa**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en el medio Moeller base descarboxilasa que contiene L-ornitina, el cambio de coloración a púrpura indica un resultado positivo.

Medio Moeller base descarboxilasa.....	0,526 g
L-Ornitina.....	0,05 g

Agua destilada..... 50 mL

#### **Anexo 16. Arginina dihidrolasa**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en el medio Moeller base descarboxilasa que contiene L-Arginina, el cambio de coloración a púrpura indica un resultado positivo.

Medio Moeller base Descarboxilasa..... 0,526 g

L-Arginina..... 0,05 g

Agua destilada..... 50 mL

#### **Anexo 17. Voges Proskauer**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en caldo nutritivo con glucosa y pasado las 24 h de incubación a 30°C, se agrega el reactivo VP 1 y el reactivo VP 2, el cambio a color lila indica un resultado positivo.

Triptona..... 10 g

Extracto de carne..... 5 g

Cloruro de sodio..... 5 g

Agua destilada..... 1000 mL

#### **Anexo 18. Indol**

Para esta prueba se cultiva durante 24-48 horas en un caldo de triptona con NaCl al 0,5% (la triptona presenta abundante triptófano). Para la posterior detección del indol se usa el reactivo de Kovacs que se puede preparar con los siguientes ingredientes:

Alcohol amílico o isoamílico (puede sustituirse por alcohol butílico).....	150 mL
p-dimetilamino-benzaldehído.....	10 g
HCl (concentrado).....	50 mL

La prueba se considera positiva con la formación de un halo fucsia.

#### **Anexo 19. Citrato de Simmons**

Se siembra una pequeña cantidad de cepa en caldo nutritivo con glucosa y pasado las 24 horas se visualiza si el cambio a color lila indica un resultado positivo.

Citrato de Simmons.....	0,607 g
Agua destilada.....	25 mL

#### **Anexo 20. Bromuro de Etidio (1 µg/mL)**

Se toma 2 µL de la solución de bromuro de Etidio y se agrega en 40 mL del gel de agarosa antes de solidificar.

Bromuro de Etidio.....	2 µL
Agarosa.....	40 mL

#### **Anexo 21. Solución TAE 50X**

Tris Base.....	242 g
Ácido acético glacial.....	57,1 mL
EDTA al 0,5M (pH=8).....	100 mL
Ajustar a pH 8,0 con ácido acético glacial.....	57,1 mL

### **Anexo 23. Solución TE**

Tris HCl..... 10 mM  
EDTA..... 1 mM

### **Anexo 24. Solución DTAB**

NaCl..... 8,766 g  
Tris HCl..... 1,5756 g  
EDTA..... 1,861 g  
DTAB..... 8 g  
Agua destilada..... 100 mL  
pH:8.8

### **Anexo 25. Solución disolvente**

NaCl..... 7,0128 g  
Agua destilada..... 100 mL

### **Anexo 26. Solución CTAB 5%**

NaCl..... 2,33 g  
CTAB..... 5 g  
Agua destilada..... 100 mL

#### **Anexo 27. SDS**

SDS.....	2,5 g
Agua destilada.....	50 mL

#### **Anexo 28. *TNE Buffer***

Tris-base.....	0,12114 g
NaCl.....	0,11688 g
EDTA.....	1,861 g
Agua destilada.....	100 mL

#### **Anexo 29. Solución de extracción para el “*método TNE Buffer*”**

Fenol.....	25 mL
Cloroformo.....	24 mL
Alcohol-Isoamilico.....	1 mL
Agua destilada.....	50 mL

#### **Anexo 30. Tampón de lavado para secuenciamiento (*Wash Buffer Clean-up*)**

Acetato de sodio 3M, pH 5,4.....	3 µL
Etanol absoluto.....	62,5 µL
Agua para secuenciamiento.....	14,5 µL